

博士論文

ミトコンドリア品質管理におけるパーキンソン病の原因遺伝子産物
PINK1 と Parkin の解析

尾勝 圭

目次

1. 略語 (Abbreviation)	・ ・ ・ 1
2. 要約 (Abstract)	・ ・ ・ 3
3. 緒言 (Introduction)	・ ・ ・ 4
4. 実験材料と方法 (Materials and Methods)	・ ・ ・ 8
5. 結果 (Results)	・ ・ ・ 14
6. 考察 (Discussion)	・ ・ ・ 20
7. 謝辞 (Acknowledgments)	・ ・ ・ 23
8. 図表の説明 (Legends to the figures)	・ ・ ・ 24
9. 文献 (References)	・ ・ ・ 30

1. 略語 (Abbreviation)

PINK1	PTEN-induced putative kinase 1
TOM	Translocase of outer mitochondrial membrane
PD	Parkinson's disease
MPP ⁺	1-methyl-4-phenylpyridinium
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
mtDNA	mitochondrial DNA
HECT	Homologous to the E6-AP carboxyl terminus
RING	Really interesting new gene
IBR	In between ring
RBR	Ring between ring
PTEN	Phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10
ATP	Adenosine Triphosphate
MTS	Mitochondrial targeting sequence
TMD	Transmembrane domain
MPP	Mitochondrial processing peptidase
PARL	Presenilin-associated rhomboid-like
AFG3L2	ATPase family gene 3 like 2
VCP	Valosin-containing protein
HA	Hemagglutinin
GFP	Green fluorescence protein
P/N	Product number
CCCP	carbonyl cyanide <i>m</i> -chlorophenylhydrazone
CMV	Cytomegalovirus
MEF	mouse embryonic fibroblast
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
FBS	Fatal bovine serum
NEAA	Non-essential amino acids
PEI	Polyethylenimine
HEK293	Human embryonic kidney 293
CIAP	Calf intestinal alkaline phosphatase
SDS	Sodium dodecyl sulfate
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis

NEM	<i>N</i> -ethylmaleimide
GST	Glutathione S-transferase
CBB	Coomassie brilliant blue
BN-PAGE	Blue native PAGE
CN-PAGE	Clear native PAGE
NAMOS-assay	Native antibody mobility shift-assay
DTT	Dithiothreitol
DMA	<i>N,N</i> -dimethylacrylamide
S.D.	Standard deviation
n.s.	not significant
pAb	Polyclonal antibody
mAb	monoclonal antibody
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
MELAS	Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes
MERRF	Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers
CPEO	Chronic progressive external ophthalmoplegia
OPA1	Optic atrophy
Mfn2	mitofusin 2
KD	Kinase dead
WT	Wild type
UBL	Ubiquitin like domain
2D	2-dimensional
FL	Full length

2. 要約 (Abstract)

パーキンソン病は神経変性疾患の一つである。常染色体劣性若年性遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子産物 PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1) と Parkin は、それぞれミトコンドリア型タンパク質リン酸化酵素とユビキチン連結酵素である。近年、PINK1 の蓄積により選別された不良ミトコンドリアを Parkin が主としてオートファジーによる分解に導く現象に注目が集まっている。しかしながら、不良ミトコンドリアを識別して蓄積する PINK1 の制御機構は不明なままであった。本研究では、不良ミトコンドリアに蓄積「量的制御」した PINK1 が自己リン酸化を受け活性型に変換していること「質的制御」を明らかにした。そのリン酸化に重要な部位が PINK1 の Ser228 と Ser402 であることを突き止めた。この両アミノ酸を Ala に置換した変異体 (phospho-deficient mutant) は Parkin を不良ミトコンドリアに局在化できないが、Glu に置換した変異体 (phospho-mimic mutant) は野生型と同様に Parkin を不良ミトコンドリアに局在化することができる。一方で、PINK1 は不良ミトコンドリア上では約 850 kDa の複合体を形成することを確認した。この複合体にはミトコンドリアタンパク質の輸送体である TOM 複合体と二分子の PINK1 が含まれていた。PINK1 G409V (kinase dead) 変異体は野生型の PINK1 と共発現することから、リン酸化型となることから、分子間での自己リン酸化反応が示唆された。パーキンソン病患者由来の多くの PINK1 変異体ではこの複合体形成とリン酸化に異常が生じており、またこれら変異体 PINK1 では Parkin の不良ミトコンドリアへの局在化も有意に減弱していた。本研究では PINK1 が Parkin を不良ミトコンドリアへ標的化するための分子メカニズムを明らかにしたが、これらはパーキンソン病発症機構の解明に繋がり得る重要な知見である。

3. 緒言 (Introduction)

パーキンソン病 (Parkinson's disease: PD) はアルツハイマー病に次いで高い罹患率を示す神経変性疾患として知られている。*PARKIN* や *PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1)* をはじめとした、多数の PD の原因遺伝子が同定されているが、それらの遺伝子産物の細胞内における動態や変異による異常のメカニズムは完全には明らかにされていない。本研究では、若年性で発症する常染色体劣性遺伝性 PD の原因遺伝子産物 PINK1 と Parkin に着目し、自己リン酸化と複合体形成という分子動態と変異による異常を明らかにした。

PD は 1817 年にイギリスのジェームズ・パーキンソンが初めて報告した疾患であり、中脳黒質緻密部においてレビー小体を伴うドーパミンニューロンの脱落により発症する。その症状は、筋強剛、安静時振戦、姿勢保持障害、動作緩慢などが知られており、日常生活に支障をきたすことがある。日本国内では 10 万人に 100-150 名の患者がいるとされ、高齢者に多い疾患でもあるので今後も患者数の増加が予測される。従って、現在も不明であるドーパミンニューロン脱落の原因解明と PD を根治できる治療方法の確立が望まれている。PD の発症様式には孤発性と遺伝性があり、遺伝性 PD 患者は全 PD 患者の約 10% とされているが、孤発性 PD 患者と類似の病態を示すことから、原因の明確な PD の原因遺伝子を用いた機能解析と原因解明に向けた研究が盛んに行なわれている。これまで、1973 年に家族性の PD が報告され¹、暫くすると 1980 年代には孤発性 PD 患者のドーパミンニューロンにおけるミトコンドリアの機能破綻が示唆された^{2,3}。具体的には、ミトコンドリア呼吸鎖 (電子伝達系) 複合体 I の阻害作用がある MPP⁺ (合成麻薬の不純物 MPTP の活性型分子) や Rotenone (農薬の成分) などが PD を引き起こすことや、一部の PD 患者から変異型 mtDNA が検出されることなどがある^{4,5}。その後、家族性 PD の原因遺伝子として *PARKIN* が単離されて、Parkin の機能解析が開始された⁶。2000 年には、当研究室を含む複数の研究グループによる先行研究から、Parkin はユビキチン連結酵素 (E3) であるという生化学的な機能が明らかにされたが、生理学的な意義や細胞内での機能についてはさまざまな報告がなされており、共通認識が得られない状態が続いていた (図 1)⁷⁻⁹。ユビキチンとは分解の目印となる低分子タンパク質 (76 アミノ酸、約 8.6 kDa) である。ユビキチンは活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチン連結酵素 (E3) へと受け渡されて、基質タンパク質に

付加される。E3 は HECT 型と RING 型大に別されてきた¹⁰。RING 型 E3 はユビキチン charged E2 から基質タンパク質に直接ユビキチンを付加するが、HECT 型はユビキチン charged E2 から自身のシステイン残基を仲介（チオエステル結合）して基質タンパク質にユビキチンを共有結合（イソペプチド結合）で付加する。近年では RING 型に属する E3 のうち、RING-IBR-RING の構造を持つ RBR 型 E3 は RING 型と HECT 型のハイブリッドであることが明らかになった¹¹⁻¹⁴。RBR 型 E3 は分子内に RING 構造をもちながら、HECT 型のようにシステインを介して基質タンパク質にユビキチンを付加する（図 2a）。Parkin も上記のような RBR 型 E3 であり、Cys431 を介した E3-ユビキチンの中間体を形成することが示唆されている。興味深いことにこの中間体はミトコンドリア膜電位が低下した時にのみ形成されることから、Parkin は通常は不活性化型であり、ミトコンドリア膜電位低下に伴い活性化すると考えられている。活性化型 Parkin は不良ミトコンドリア上の複数のタンパク質（mitofusin, mitoNEET, HKI, Miro, VDAC, Tom70 など）をユビキチン化することが明らかにされている。

E3 によって基質タンパク質に付加されたユビキチンは7つのリジン残基または開始メチオニンを介してポリユビキチン鎖を形成することで多様な役割を担う¹⁵。代表的な役割は、48 番目のリジン残基を介したポリユビキチン鎖であり分解の目印となる。他にも 63 番目のリジン残基を介したポリユビキチン鎖がシグナル伝達などの足場となることも知られている。ユビキチン化されたタンパク質は巨大なタンパク質分解装置であるプロテアソームにより選択的な分解へ導かれる（ユビキチン・プロテアソーム経路）¹⁶。一方で、ミトコンドリアなどの細胞内小器官や非選択的な分解経路としてオートファジー／リソソーム経路も知られている（図 2b）。オートファジー（自食作用）は飢餓等に応答して細胞質成分を非選択的に取り組みリソソームと融合して内容物を分解する経路であるが、最近ではストレスで生成されたタンパク質凝集体・異常ミトコンドリア等のオルガネラ・細胞内に侵入した細菌などなど選択的には破壊するシステムが注目されている¹⁷⁻¹⁹。Parkin によるユビキチン化はモノユビキチン化または K27, K48, K63 を介したユビキチン鎖を形成することが知られている。

一方で、PINK1 はミトコンドリア局在型タンパク質リン酸化酵素（セリン／スレオニンキナーゼ）として知られている。この遺伝子は PTEN 誘導性のタンパク質リン酸化酵素として 2001 年に発見され²⁰、2004 年には PD の原因遺伝

子として報告された²¹。しかし、PINK1もParkinと同様に細胞内局在を含め多くの報告がなされてきたが、作用機序に関しては共通認識が得られていなかった。ところが、2006年に*Drosophila melanogaster*を用いた遺伝学的研究からPINK1がParkinの上流で働いていることが明らかになり、2008年にはParkinが膜電位の低下した不良ミトコンドリアに局在化して、分解へ導くという驚くべき現象が報告された²²。学位申請者を含む研究グループはPINK1がParkinの局在化を誘導しており、PINK1とParkinが協調してミトコンドリアの品質管理を行なっていることを明らかにしてきた(図1)^{23,24}。

ミトコンドリアは、内膜を隔てる電位差(膜電位:呼吸鎖/電子伝達系で創出)を原動力としてF₀F₁-ATP合成酵素を回転させて、細胞内のエネルギー(ATP)を合成している(図3)²⁵。ミトコンドリアは常に分裂と融合を繰り返す非常に動的な細胞小器官であり、膜電位の低下した不良なミトコンドリアはこのサイクルから外れて、分解へ導かれる(図4)²⁶。ミトコンドリアはエネルギー産生の他に脂質代謝・カルシウムイオン濃度の調節・細胞死に関わる機能など多くの重要な役割を担っており、その品質を保つことは神経細胞のような非分裂細胞において重要であると考えられる²⁷⁻³¹。*parkin*や*pink1*欠損*Drosophila melanogaster*は飛翔筋の変性や短命、雄性不稔、エネルギーの減少などが観察されている³²⁻³⁴。加えて最近では*parkin*欠損時にドーパミンニューロンのミトコンドリア膜電位が低下していることや不良ミトコンドリアが*parkin*依存的に処理されていることが明らかになった³⁵⁻³⁷。また、ミトコンドリア融合因子や分裂因子等の形態制御因子との遺伝学的な相互作用^{38,39}やミトコンドリアの電子供与体が*pink1*欠損の表現型を回復させることなども報告されている^{40,41}。*Pink1*や*Parkin*欠損マウスではPD様の行動の異常などは観察されないが、線条体領域における僅かながら形態的・機能的なミトコンドリアの異常が報告されている⁴²⁻⁴⁸。これらの観察からもPINK1とParkinがミトコンドリアの健強性の維持に貢献していることが示されている(図4)。

このような生理的意義に関わる情報が徐々に蓄積する中で、これまで共通認識が得られていなかったPINK1とParkinの作動メカニズムも徐々に解明されつつある。その一つがPINK1の「量」による制御である。ミトコンドリア内膜やマトリックスへのタンパク質の輸送は膜電位に依存して進行することが知られている⁴⁹。PINK1はN末端にミトコンドリア輸送シグナル(Mitochondrial targeting signal: MTS)とその後に膜貫通領域(Transmembrane domain:

TMD) を有しており、C 末端側には細胞質に露出するキナーゼドメインをもつタンパク質である。通常は N 末端の MTS によりミトコンドリア膜電位に依存した輸送経路でミトコンドリア内膜へ運ばれていると考えられる。内膜へ輸送された PINK1 は MPP、PARL、AFG3L2 などのミトコンドリア内膜のプロテアーゼ群によって切断され、駆動力を失った C 末端側のキナーゼドメインは細胞質に放出されて、N-end rule に従いながらプロテアソーム依存的に分解へ導かれる⁵⁰⁻⁵⁴。一方で、膜電位の低下はミトコンドリア内膜の輸送を停止させ、PINK1 の外膜への蓄積を引き起こす^{23,24,55}。この PINK1 の蓄積が不良ミトコンドリアを選別し、細胞質の Parkin を不良ミトコンドリアへ局在化させる。不良ミトコンドリアへ局在化した Parkin は、活性型となり複数の基質タンパク質をユビキチン化する^{12,56-58}。このユビキチンが目印となり、ユビキチン認識タンパク質である p62 や p97/VCP がミトコンドリアへ集積して、最終的にプロテアソームによるミトコンドリアタンパク質の分解やミトコンドリア自体の移動（封入体として隔離）、オートファジーによる分解を制御する^{22,23,59-65}。加えて、申請者らは Parkin と PINK1 の協調した不良ミトコンドリア処理が、PD 患者由来の PINK1 や Parkin の変異体で減弱または完全に停止することを明らかにして、この経路の破綻、即ち異常ミトコンドリアの蓄積がニューロン死・神経変性を引き起こし、最終的に PD の発症に繋がる可能性が高いことを報告した⁶⁶。

しかし、膜電位低下に伴い蓄積した PINK1 の動態は不明のままであった。本研究では PINK1 のリン酸化による翻訳後修飾を伴う PINK1 の活性化機構と複合体の解析を行なうことで、不良ミトコンドリア上での PINK1 の動態を明らかにした。これらの現象は PD 患者由来の多くの変異体 PINK1 で異常が観察され、Parkin 依存的な不良ミトコンドリアの処理機構に重要な役割があることが明らかとなった^{67,68}。

4. 実験材料と方法 (Materials and Methods)

抗体

1次抗体として抗Flag/DDDDK (clone M2; Sigma, clone FLA-1; MBL)、抗HA (clone 4B2; Wako)、抗GFP (clone 3E6; wako, product number (P/N) A6455; Life Technologies, P/N ab6556; abcam)、抗actin (clone AC-40; Sigma)、抗Parkin (clone PRK8; Sigma)、抗PINK1 (P/N BC100-494; Novus)、抗Tom20 (P/N FL-145またはclone F-10; Santa Cruz)、抗Tom22 (clone 1C9-2; Sigma)、抗Tom40 (三原研究室より分与)、抗Tom70 (三原研究室より分与)、抗V5 (P/N 46-0705; Life Technologies)、抗mCherry (clone 3G5; MBL) 抗体を使用した。

2次抗体として Alexa fluor 488, 568 結合型抗 mouse / rabbit / ginia pig IgG 抗体 (Life Technologies) またはアルカリフォスファターゼ結合型抗 mouse / rabbit IgG 抗体 (Santa Cruz) を使用した。

試薬

ミトコンドリアの膜電位消失のために、脱共役剤として carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP, Sigma または Wako)を使用した。CCCPと同様にミトコンドリアの膜電位を消失させる別の試薬としてカリウムイオンのイオノフォアである Valinomycin (Sigma)、呼吸鎖複合体 I の阻害剤として Rotenone (Sigma)を使用した。

プラスミド

使用したプラスミドは表 1 にまとめた。一過的な発現には pcDNA3.1、pCMV14(sigma)、pEGFP、pCMVTNT、pCMVTNT (d1)を使用した。安定発現細胞株の取得には pMXs-puro を使用した。

培養細胞の培養方法

HeLa 細胞は 37°C、不死化した mouse embryonic fibroblast (MEF) は 32°C、5% CO₂ の条件で培養を行なった。培養には Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with glucose and L-glutamine (Sigma)に penicillin / streptomycin / glutamine と 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco)、1×MEM non-essential amino acids (1×MEM NEAA, Gibco)、1 mM sodium

pyruvate (Gibco) を添加した培地を使用した。

Plat-E細胞は37°C, 5% CO₂の条件で培養を行なった。培養には上記の組成のDMEMに5 µg/ml puromycin と 5 µg/ml blastcysine を添加した培地を使用した。

遺伝子導入法

HeLa 細胞には Fugene 6 (Roche) を用いて様々なプラスミドを導入し、一過性の過剰発現を行なった。MEF への一過的な遺伝子導入は Polyethylenimin (PEI: linear, M.W. ~ 25kDa, Polyscience Inc.) を用いて行なった。HeLa 細胞および MEF の安定発現株は Plat-E システムを用いたレトロウイルス感染により樹立した。pMXs-puro に目的の遺伝子を組込んだプラスミドを作製後、Plat-E 細胞 (HEK293 細胞由来のレトロウイルスパッケージング細胞) に Fugene 6 を用いてプラスミドを導入した。37 °C で 24 時間培養した後に培地交換を行い、レトロウイルスを産生させるために、さらに 37 °C で 24 時間培養を続けた。ウイルスを含む培養液を回収して 8 µg/ml polybrene (Sigma) を加え、予め用意した MEF 細胞や Slc7A1/mCAT-1 (マウス由来のレトロウイルス受容体)を一過性に過剰発現させた HeLa 細胞の培養液と置換した。ウイルス感染した細胞は翌日に新しい培地と置換して、さらに 24 時間培養を続けた後で 5 µg/ml puromycin または 5 µg/ml blastcysine を含む培地に置換することで薬剤耐性細胞を選択した。

脱リン酸化酵素処理

Calf intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP、Takara) 処理は遠心法により集められたミトコンドリア粗画分 (10 µg) に対して行なった。PINK1-3HA 導入または非導入 HeLa 細胞を CCCP で処理した後に、ミトコンドリア粗画分を集めて 0、10、30 U の CIAP を反応バッファー (50 mM Tris-HCl pH 9.0、1 mM MgCl₂、0.3 M trehalose) に加えて表記の温度で 1 時間反応させた。

細胞分画

細胞分画には 0.25 M Sucrose を含む HEPES Buffer (20 mM HEPES-NaOH pH 8.1) を用いて氷中に行なった。細胞は冷えた 25-gauge (G) 針と 1-ml シリンジを 30 回通過させることで破碎した。未破碎細胞と核、細胞膜成分を除去す

るために遠心分離 (1,000 g、7 分間、4°C) を行ない、上清を Input sample として回収した。続いて遠心分離 (10,000 g、10 分間、4°C) を行い、沈殿を粗ミトコンドリア画分として回収した。

免疫沈降

抗 Flag 抗体結合アガロース (M2 アガロース、Sigma) 細胞抽出液を抗体と反応させ、4°C で 1 時間免疫沈降を行なった。

Phos-tag SDS-PAGE

リン酸化タンパク質の検出のために 50 μ M Phos-tag アクリルアミド (Wako) と 100 μ M $MnCl_2$ を含むゲルを作製した上で、SDS-PAGE を行なった。電気泳動後のゲルは 0.01% SDS と 1 mM EDTA を含む転写 Buffer に浸し、室温で 10 分間震盪した。続けて 0.01% SDS を含む転写 Buffer に浸し、室温で 10 分間震盪した。Mn イオンを除去したゲルは次にウエスタンブロッティングに使用した。

細胞からのタンパク質抽出とウエスタンブロッティング

HeLa 細胞, MEF は氷上で TNE-N⁺ Buffer (1% NP-40、20 mM Tris-HCl pH8.0、150 mM NaCl、10 mM EDTA pH8.0、protease inhibitor (Roche)、phosphatase inhibitor (Roche)、10 mM *N*-ethylmaleimide (NEM、Wako) により細胞を溶解し、超音波破碎を 10 秒間行なった。さらに、遠心分離 (13,500 rpm、4°C、10 分間) を行ない、上清を細胞抽出液として回収した。回収した細胞抽出液は BCA 法によりタンパク質濃度を定量した後に 6×SDS sample Buffer を添加した。サンプルは 98°C で 5 分間煮沸を行ない、SDS-PAGE に用いた。

ウエスタンブロッティングでは NuPAGE システム (Life Technologies) を利用して、SDS-PAGE と polyvinylidene difluoride 膜 (PVDF 膜, Millipore) への転写を行なった。タンパク質の転写された PVDF 膜は 5% スキムミルクで 30 分間のブロッキングを行い、1 次抗体との反応を 1 時間、2 次抗体との反応を 45 分間行なった。抗体との反応が終わった PVDF 膜はアルカリフォスファターゼの基質である NBT / BCIP (Promega) を用いて検出を行なった。

免疫染色

HeLa 細胞と MEF を poly-L-Lysine コートされた 3.5 cm bottom glass dish (Mat Tek) に播種した。4% paraformaldehyde で固定を 15 分間行ない、50 μ g/ml digitonin (Wako) で Permeabilize を 15 分間行った。0.1% ゼラチンを用いて 30 分間のブロッキングを行なった後に、1 次抗体と 1 時間反応させて、2 次抗体も 1 時間反応させた。最後に Slow Fade Gold Antifade (Life Technologies) を用いて封入を行った。これらの操作は全て室温で行なった。染色した細胞の画像取得には共焦点顕微鏡 LSM510 META、710、780 (Carl Zeiss Inc.) を使用した。

PINK1-GST の精製と LC-MS/MS 解析

PINK1-GST を安定的に発現した HEK293T 細胞を用いて、CCCP 処理を 3 時間行なった。その細胞をタンパク質の抽出方法に従いながら抽出した。抽出された PINK1-GST を含むタンパク質は Glutathione Sepharose™ 4B (GE Healthcare) と混ぜ合わせることで PINK1-GST とセファロースを結合させた。溶出には 10 mM の還元型グルタチオン (Sigma) を含む TNE-N⁺ Buffer を使用した。精製した PINK1-GST は SDS-PAGE で分離後に CBB 染色を行なった。PINK1-GST を含むバンドは切り取った後に、還元処理とアルキル化を行ない、プロテアーゼ処理に使用した。タンパク質の切断にはエンドプロテアーゼである Asp-N (Roche) を使用し、12.5 mM ammonium bicarbonate、5 mM Tris-HCl pH8.0 中で 37°C、16 時間処理を行なった。切断されたペプチドは LTQ Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Scientific) と Xcalibur (Thermo Scientific) により解析した。ピークリストファイルは、Mascot サーチエンジン (Matrix Science) の MS/MS サーチ機能を利用してタンパク質データベースである NCBI 中の *Homo sapiens* のタンパク質と照会した。

Blue Native-PAGE/Clear Native-PAGE

Blue native PAGE (BN-PAGE) は企業のプロトコールを参照し、Clear native PAGE (CN-PAGE) は Wittig と Schagger's らの方法⁶⁹⁻⁷²を基に PINK1 複合体を検出するために最適な条件へ改変した。具体的な方法は下記に示す。BN- または CN-PAGE での解析のためのサンプルは Native™ PAGE Sample Prep Kit (Life Technologies) を使い調製した。細胞は 1% digitonin を含む 1x Native™ PAGE buffer にて 4°C で 15 分間浸すことで溶解した。その後、セルスクレーパ

一で剥がされた細胞溶解液は10回ピペティングを行い均一化した。沈殿物を取り除くために遠心分離 (20,000 g、4°C、30分) を行なった。BN-PAGE or CN-PAGE はそれぞれ 0.002% Coomassie Brilliant Blue G-250 (Life Technologies) または 0.05% sodium cholate (Wako) と 0.01% *n*-Heptyl- β -D-thiogluconide (DOJINDO) を含む Native™ PAGE Running Buffer (Life Technologies) を用いて行なった。CN-PAGEで分離後のゲル中における蛍光タンパク質の検出にはTyphoon 9400 fluorescence scanner (GE Healthcare) を使用した。一方でBN-PAGE後にゲル内のタンパク質を変性と負電荷を付加するために予め60°Cに温めた変性buffer (10 mM Tris-HCl pH6.8, 1% SDS and 0.006% 2-mercaptoethanol) に浸して15分間震盪した。その後、PVDF膜へ転写した。

Native antibody-based mobility-shift assays (NAMOS-assay)

PINK1複合体の構成因子を調べるためにNAMOS-assayを行なった⁷³。細胞溶解液に抗体を加え、室温に1時間静置することで反応させた。これらのサンプルをCN-PAGEでの解析に供した。

2D BN-/Phos-tag SDS-PAGE

2D BN-/Phos-tag SDS-PAGE は1次元目にBN-PAGEで分離を行い、2次元目にPhos-tag SDS-PAGEを行なった。BN-PAGE後に1レーン分に切り取られたゲルは、企業のプロトコールに従い、還元溶液 (50 mM DTT を含む SDS sample buffer) とアルキル化溶液 (50 mM *N,N*-dimethylacrylamide (DMA) を含む SDS Sample Buffer) にそれぞれ浸しながら60°Cで15分間震盪した。アルキル化を停止させるために停止液 (5 mM DTT と 20% methanol を含む SDS sample buffer) に浸しながら60°Cで15分間震盪した。これらの処理後のゲルを用いて2次元目のPhos-tag SDS-PAGEを行なった。

統計処理

統計処理を行なうために、免疫染色を行った100細胞についてParkin/PINK1のミトコンドリアへの移行や、ミトコンドリアの分解・集合などを測定した。その作業を独立に3回行ない平均値を算出した。さらに、S.D. (Standard Deviation) を求めた。有意差検定にはウェルチの方法に基づいた *t*

検定を行なった。n.s. は not significant (非有意)を示している。これらのデータ処理には Microsoft office の Excel を用いた。

5. 結果 (Results)

PINK1 はミトコンドリア膜電位の低下時に自己リン酸化する

ミトコンドリア膜電位の低下した不良ミトコンドリアに輸送された PINK1 は内膜まで輸送されず、切断と分解を免れる²³。この量的な制御に基づく不良ミトコンドリアの選別機構で Parkin は不良ミトコンドリアへ局在化する。PINK1 の過剰発現は、Parkin の正常な (膜電位の低下していない) ミトコンドリアへの局在化を誘導する (図 5a)^{24,74,75}。この時のタンパク質量を検出すると、過剰発現した PINK1 と比較して CCCP 処理後の内在性 PINK1 タンパク質の量は圧倒的に少ない (図 5b)。それにも関わらず、Parkin の局在化効率は CCCP 処理の時の方が有意に高い (図 5a)。このことは PINK1 が量以外の制御も受けている可能性を示唆している。そこで、PINK1 が翻訳後修飾を受ける可能性を考えた。PINK1 はセリン/スレオニンキナーゼであることから、まず Phos-tag を用いたリン酸基アフィニティーゲル電気泳動 (Phos-tag SDS-PAGE) によりリン酸化を確かめた。Phos-tag はアクリルアミドと共有結合でき、マンガンイオンと錯体を形成する低分子化合物である⁷⁶。マンガンイオンと錯体を形成した Phos-tag-Mn²⁺はリン酸化タンパク質を捉え、結果としてリン酸化タンパク質の移動度が遅くなる。PINK1 は CCCP 処理後、約 15 分からシフトしたバンドが観察でき、期待通りにリン酸化を受けていることが示唆された。Phos-tag 非含有ゲルである、4-12% precast ゲルでは殆どシフトバンドは形成されず、7.5% Tris-glycine ゲルでは僅かなシフトであった。しかし、Phos-tag を加えたゲルを使用することで明瞭な複数のシフトバンドを検出するに至った (図 5c)。また、試験管内で合成された PINK1 と比較しても CCCP 処理により生じた PINK1 は移動度が遅れた (図 5d)。PINK1 欠損細胞にキナーゼ活性の無い変異体 (K219A、D362A、D384A)⁷⁷ を発現させて、CCCP 処理を行なっても PINK1 の蓄積は観察されたがバンドのシフトは観察されなかった (図 5e)。このことは PINK1 のリン酸化は自己リン酸化であることを示唆している。重要なことに、内在性 PINK1 のリン酸化状態を観察すると蓄積したほぼ全ての PINK1 がリン酸化状態であった (図 5f)。加えて、外来性および内在性のリン酸化型 PINK1 に対して脱リン酸化酵素 (CIAP) 処理を行なうことでバンドシフトの消失を観察して、PINK1 の膜電位低下依存的なバンドシフトがリン酸化によることを確認した (図 5g)。次に、脱共役剤である CCCP と同じように膜電位を低下させる

イオノフォア Valinomycin や、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I の阻害剤である Rotenone で HeLa 細胞を処理することにより、PINK1 がリン酸化状態になることを観察した (図 5h)。

PINK1 活性化ループ内の Ser402 変異は自己リン酸化を減弱する

この PINK1 のリン酸化部位を特定するにあたり、まず活性化ループに着目した。多くのキナーゼは活性化ループのアミノ酸がリン酸化することで、キナーゼ活性を上昇することが知られている⁷⁸⁻⁸⁰。活性化ループは保存されたキナーゼ構造の C 末端側 (C ロープ) 中に含まれ、DFG と APE に挟まれた領域として知られている。ヒト PINK1 では Asp384 から Glu417 が活性化ループに該当する。PINK1 はこの領域内に三つセリン (Ser393、401、402) が存在している。この部位に対して単独または複数箇所の組み合わせでアラニン変異を導入した。この変異体 PINK1 を用いて Phos-tag SDS-PAGE によりリン酸化状態を確認した。興味深いことに、Ser402 変異を含む全ての変異体でリン酸化の減弱を確認することができた (図 6a)。また、Ser402 は、Ser393 や Ser401 と比較して進化的にも非常に良く保存されていた (図 6b)。しかし、S402A 変異体では、明瞭なバンド消失が観察されるものの、依然として残存したリン酸化バンドが検出された。この結果は、S402A 以外にリン酸化部位が存在することを示唆している。

PINK1 の Ser228 はリン酸化部位である

次に、他のリン酸化サイトを探すために LC-MS/MS により探索を行なった。PINK1-GST を安定的に発現した HEK293T 細胞を使い、CCCP 処理依存的にリン酸化される部位を探索した。その結果、PINK1 の Ser228-230 がリン酸化していることが示唆された (図 7a,b)。また、この近傍の配列を確認すると PINK1 の Ser228 は線虫以外で保存され、Ser229 と Ser230 は線虫とショウジョウバエ以外で保存されていた。また、この断片に含まれる Ser225 も保存度は高かった (図 7c)。一方で、キナーゼは特徴的な構造を持つため、PINK1 の立体構造が予測されている⁸¹。予測された PINK1 の立体構造において Ser/Thr を黄色で示した。PINK1 の Ser228-230 と Ser402 を観察すると非常に近接していることが明らかとなった。また、PINK1 の Ser167 も非常に隣接していた (図 7d)。次に、実際にこれらの部位をアラニンに置換した変異体を作成してリン酸

化状態を確認した。その結果、S228A 変異体ではリン酸化バンドが一本消失していた。また、S225A はバンドが少し上方にシフトしていた (図 7e)。さらに Ser402 とこれらの部位を同時に変異した二重変異でリン酸化状態を検証すると、S228A/S402A 変異体でリン酸化バンドが完全に消失した (図 7f)。

PINK1 の Ser228 と Ser402 変異体は Parkin の標的化を制御する

これらのリン酸化が Parkin の機能 (活性化や局在化) に与える影響を調べた。図 5a で示したように、PINK1 と Parkin は共過剰発現すると量による制御が機能せず、Parkin が正常なミトコンドリアへ標的化されてしまう^{24,74,75}。そこで、通常の CMV プロモーターの一部を欠失させることで発現量を低減したプロモーター (CMV d1) を使い Parkin を正常なミトコンドリアに標的化しない条件を整えた (図 8a,b)。その実験系を用いて、PINK1 欠損細胞に野生型 PINK1 または PINK1 S228A/S402A (非リン酸化型変異体)、PINK1 S228D/S402D (疑似リン酸化型変異体) を発現させ、GFP-Parkin の GFP を偽基質とした E3 活性の観察を行なった。野生型で膜電位の低下依存的に E3 が発揮されユビキチン化様の分子量のシフトが観察できる条件下で、PINK1 S228A/S402A はシフトが見られず、PINK1 S228D/S402D は再びシフトを観察することができた (図 8c)。また、野生型の PINK1 は Phos-tag SDS-PAGE でリン酸化に依存する二つのシフトバンドが観察できるが、PINK1 S228A/S402A と PINK1 S228D/S402D はシフトバンドが検出されず、変異によりリン酸化は受けないことが示唆された (図 8d)。これらの PINK1 は全てミトコンドリア膜電位の低下に伴い不良ミトコンドリアに集積することも確認された (図 8e)。一方で、PINK1 S228A/S402A のみで Parkin の局在変化が観察されず、PINK1 S228D/S402D で野生型と同程度の不良ミトコンドリアへの局在化効率を観察することができた (図 8f,g)。これらのことから、PINK1 の二つの部位の自己リン酸化は Parkin の局在変化 (不良ミトコンドリアへの輸送) に重要であることが示された。

PINK1 は不良ミトコンドリア上で約 850 kDa の複合体を形成する

ミトコンドリア膜電位低下時の PINK1 の複合体状態を調べるために Blue Native-PAGE (BN-PAGE) を行なった。HeLa 細胞にタグ無し PINK1 を発現して、CCCP によりミトコンドリアの膜電位を低下させると、約 850 kDa の複合体を形成した (図 9a)。この複合体はミトコンドリア画分からも検出された

(図 9b)。そして、内在性 PINK1 も同様の位置に複合体を形成することが確認できた (図 9c)。さらに、複数の PINK1 複合体を同時に検出するために Clear Native-PAGE (CN-PAGE)を行ない、異なる蛍光タンパク質を融合した PINK1 を同時に検出する手法を確立した (図 9d,e)。

PINK1 複合体には TOM 複合体と二分子の PINK1 が含まれる

複合体と抗体を混合した際に生じるバンドのシフトによって構成因子を調べる Native antibody mobility shift (NAMOS) -assay⁷³によって、PINK1 の複合体の構成因子を探索した。初めに PINK1-GFP に対して抗 PINK1 抗体や抗 GFP 抗体を加え、実験系の確認を行なった。BC100-494 は PINK1 の 175-225 a.a. を認識するポリクローナル抗体 (pAb) であり、A5455 や ab6556 は GFP を認識するポリクローナル抗体である。一方で、3E6 は GFP を認識するモノクローナル抗体 (mAb) である。ポリクローナル抗体は複数箇所を認識するため CN-PAGE 後に複数のバンドやスメアとして検出される。一方で、モノクローナル抗体は単一の抗体のため、単一のバンドシフトとして検出される (図 10a)。この NAMOS-assay によりミトコンドリアタンパク質の輸送体である Translocase of outer mitochondrial membrane (TOM) 複合体を PINK1 複合体の構成因子として検出した。Tom 複合体は Tom40 と Tom22 を含むコア複合体と Tom20 や Tom70 の受容体で構成されている。その中でも PINK1 複合体には Tom40、Tom22 と Tom20 が含まれていた (図 10b)。加えて、二種類の異なる蛍光タンパク質を融合した PINK1 (PINK1-GFP または PINK1-mCherry) を用いて解析を続けた。PINK1-GFP に抗 GFP 抗体を加えるとシフトバンドが観察できるが、PINK1-mCherry に抗 GFP 抗体を加えてもシフトバンドは観察できない。一方で、PINK1-GFP と PINK1-mCherry を共発現して、抗 mCherry 抗体を加えると PINK1-GFP のバンドのシフトが観察できる。さらに、抗 GFP 抗体と抗 mCherry 抗体を加えると二つ分のバンドのシフトが観察できる。また、PINK1-mCherry に対する抗 GFP 抗体の影響も同様である (図 10c)。従って、PINK1 の複合体には少なくとも二分子の PINK1 が含まれていた。一方で、PINK1-GFP、PINK1-mCherry、PINK1-V5 と抗 GFP 抗体、抗 mCherry 抗体、抗 V5 抗体を用いて三分子以上の PINK1 が含まれる可能性について検証したが、二分子分のシフトバンドしか観察されず、三分子以上の PINK1 が含まれる可能性に関しては否定的な結果であった (図 10d)。

PINK1 複合体にはリン酸化型 PINK1 が含まれる

リン酸化とこの PINK1 の複合体の関わりについて調べるために、BN-PAGE 後に Phos-tag SDS-PAGE を行なった。過剰発現時に通常の状態が生じる全長及び切断型 PINK1 は様々な分子種となりスメア状態に散在している一方で、この複体内に含まれる PINK1 はほぼ全てがリン酸化状態にあることが示された (図 11a-d)。

患者由来の変異体 PINK1 は複合体形成とリン酸化に異常が生じる

10 個の患者由来の PINK1 変異体を用いて、複合体形成と疾患との関連を調べた。ここで用いた変異体は C92F、A168P、E240K、H271Q、G309D、L347P、G386A、G409V、E417G、534insQ (PINK1 の 534 番目のアミノ酸としてグルタミンが挿入されている) である。これらの変異体のうち、C92F、G309D、G409V 以外の変異体は複合体が減弱または消失していた (図 12a)。細胞内でタンパク質が合成されていることは SDS-PAGE を用いて検証した (図 12b)。さらに、複合体の形成できる PINK1 C92F、G309D、G409V 変異体は野生型と同様にいずれも TOM 複合体を構成因子として含んでいた (図 12c)。複合体形成能を検証した際と同様の PINK1 変異体を用いて、PINK1 の自己リン酸化能を検証した。PINK1 A168P、E240K、G386A、G409V 変異体は微弱かつ異常なリン酸化パターンを示し、H271Q、L347P、E417G、534insQ 変異体では完全にリン酸化バンドが消失していた (図 12d)。

PINK1 は分子間でリン酸化反応を行なう

次に、変異体 PINK1 と野生型 PINK1 を共発現することで、分子間でのリン酸化反応が引き起こる可能性を検討した。興味深いことに PINK1 G409V (kinase dead) 変異体においては、単独発現時はリン酸化に依存するシフトバンドが観察できなかったが、野生型 PINK1 を共発現することでリン酸化に依存するシフトバンドを観察することができた (図 13a)。この野生型 PINK1 と共発現した時に観察される G409V のシフトバンドは、PINK1 のキナーゼ活性の変異体と共発現した時には観察されなかった (図 13b)。この結果は少なくとも PINK1 の自己リン酸化反応は、分子内反応でなく分子間でリン酸化修飾を行なう段階が存在していることを示唆している。また、PINK1 の C92F や G309D といった複合体を形成できる変異体は単独発現時にもリン酸化に依存するシフ

トバンドを観察でき、複合体形成とリン酸化反応に相関が見られた。

患者由来の変異体 PINK1 は Parkin の不良ミトコンドリアへの移行が低下する

PINK1 欠損細胞に図 12、13 で使用した 10 個の患者由来の変異体 PINK1 と GFP-Parkin を導入した細胞を作成した。CCCP 処理によりミトコンドリア膜電位を低下させると C92F を除く一連の変異体で Parkin の局在化効率が有意に減弱または消失していた (図 14a)。また、GFP-Parkin の GFP を偽基質とした E3 活性の検証でも、野生型の PINK1 と比較して C92F を除く一連の変異体で Parkin の E3 活性が減弱または消失していた (図 14b)。PINK1 C92F 変異体は、十分な家系調査がなされておらず、PD を引き起こす変異でない可能性も残されている⁸²。C92F 変異を除く多くの変異体の結果を踏まえると、PINK1 の複合体形成とリン酸化の異常が Parkin 依存的なミトコンドリア品質管理機構の破綻に繋がると考えられる。報告された C92F 変異は、遺伝的な家系解析がなされておらず、明確に PD 変異ではなく SNP (一塩基多型) である可能性も残されている。

6. 考察 (Discussion)

本研究では、不良ミトコンドリア上に蓄積した PINK1 の翻訳後修飾 (リン酸化) を伴う活性化と複合体形成を明らかにした (図 15 のモデル図参照)。これら PINK1 の変化は Parkin 依存的なミトコンドリア品質管理機構に重要であり、PINK1 と Parkin の分子機構を理解する上で重要な知見であると考えられる。

過剰量の PINK1 は、膜電位の高い健全なミトコンドリアへも Parkin を局在化することができる (図 5a, b)。この現象は、人工的で生体内では考えられないほど過剰量の PINK1 が、切断と分解を介した量による制御を乗り越えた結果であると考えられる。しかし、膜電位低下時に蓄積した内在性 PINK1 の量は過剰量の PINK1 と比較して圧倒的に少ないが、Parkin のミトコンドリアへの局在化能は有意に高い。この時に重要となるのが PINK1 の複合体形成とリン酸化による「質的制御」である。PINK1 のリン酸化部位として Ser228 と Ser402 が同定され、この 2 カ所は予測立体構造上では非常に隣接していた。今後、PINK1 のリン酸化を含めた構造的な知見が必要ではあるが、これは Ser228 と Ser402 のリン酸化が活性化ループの開口に影響を与え、活性化に繋がる可能性が考えられる。

一方で、PINK1 は不良ミトコンドリアに集積した際に、約 850 kDa の複合体を形成することが明らかとなった。さらに、異なる蛍光タンパク質を融合した PINK1 を同時に検出するために CN-PAGE を確立した (図 9)。また、複合体と抗体とを反応させる NAMOS assay により多数の複合体の構成因子を同時に、簡便に検出することができた。NAMOS assay ではポリクローナル抗体 (pAb) を使用するとラダーやスメアとして検出され、モノクローナル抗体 (mAb) を使用すると単一のバンドシフトを引き起こす (図 10a)。この解析手法を用いて TOM 複合体の構成因子が同定された (図 10b)。PINK1 は N 末端にミトコンドリア局在のためのシグナル配列を有しており、このようなミトコンドリアタンパク質は Tom20 を含む TOM 複合体に輸送される⁴⁹。一方で、一部の複数回膜貫通型のミトコンドリアタンパク質は Tom70 を含む輸送体で輸送されることが報告されており⁸³、妥当な結果かもしれない。さらに、この複合体における PINK1 の化学量論的な情報を得るために、異なるタグを融合した PINK1 を同時に発現させて検証した。その結果、2 種類のタグと 2 種類の抗体を使用すると 2 段階のシフトが観察される一方で、3 種類のタグと 3 種類の抗体を使用しても

2 段階のシフトしか観察されなかった。このことは、この複合体には 2 分子の PINK1 は含まれるが、3 分子以上の PINK1 は含まれる可能性は低いと考えられる (図 10c,d)。一方で、BN-PAGE や CN-PAGE で検出される分子量は厳密ではないとは言え、PINK1 複合体の約 850 kDa から Tom 複合体の約 480 kDa と PINK1 二分子の約 130 kDa を差し引いても、約 240 kDa の余剰が存在している。このことは、PINK1 複合体に他のタンパク質も含まれていることを示唆している。

細胞膜に存在する受容体型キナーゼは二量体を形成して、細胞内の情報伝達を行なうことが知られている⁸⁴。同様に、PINK1 も二量体形成により不良ミトコンドリアの出現を Parkin に伝えている可能性が考えられる。PINK1 から Parkin へのシグナル伝達を考える上で、二量体を形成した PINK1 が分子間でリン酸化を行なう反応があることは少なくとも事実である(図 13)。また、キナーゼ活性のない PINK1 がリン酸化型 PINK1 に転換しないことも確認されており(図 1e)、分子内自己リン酸化反応が起きている可能性が高いと考えられる。しかし、本結果からは PINK1 以外のキナーゼが PINK1 によりリン酸化されて、そのキナーゼが PINK1 をリン酸化するという可能性は完全に排除することができない。複合体形成の再構成という難題はあるが、今後は精製 PINK1 を用いたリン酸化の検証が必要と考えられる。一方で、二量体を形成するキナーゼは対称的な構造をとる分子と、非対称的な構造をとる分子が存在している⁸⁴。そのことを踏まえると PINK1 がどのような構造をとるのか、また TOM 複合体と 2 分子の PINK1 の位置関係はどのようになっているのか、依然として不明な点も残されているので今後の解析が必要である。

これまでにミトコンドリアに関係する因子(呼吸鎖構成因子や融合の制御因子など)の変異により、脳や心筋などエネルギーの需要の多い器官に異常が生じやすいことが知られている⁸⁵。例えば、mtDNA の異常に由来する一連の疾患には、脳卒中様発作症候群 (MELAS)、ミオクローヌステんかん (MERRF)、慢性進行性外眼筋麻痺症候群 (CPEO) などがある⁸⁶。ミトコンドリア内膜の融合因子 OPA1 の変異が優性視神経萎縮症 (Dominant Optic Atrophy type I) の原因遺伝子として、ミトコンドリア内膜の融合因子 Mfn2 の変異がシャルコー・マリー・トゥース病 (Charcot-Marie-Tooth disease Type 2A) の原因遺伝子として報告されている⁸⁵。PD も中脳黒質緻密部のドーパミンニューロンの脱落により発症する疾患であると同時に、ミトコンドリアの呼吸鎖複合体の阻害剤が

PD を引き起こすことも知られており、PINK1/Parkin 依存的なミトコンドリア品質管理機構の破綻に伴うミトコンドリア品質の低下が PD の発症に関与している可能性は十分に考えられる。本研究により明らかにした PINK1 の蓄積やリン酸化という基礎的な知見は、高感度のリン酸化型 PINK1 抗体の作製などにより不良ミトコンドリアの存在を検証する手段の開発に有用である。今後はヒト PD 患者切片を用いた病理学的な研究等への展開が期待される。

本研究では PINK1 が不良ミトコンドリアを処理するために、膜電位依存的な分解から免れて蓄積する「量的制御」に加えて、複合体形成や自己リン酸化を伴いながら Parkin を細胞質から不良ミトコンドリアへ局在化させる「質的制御」を明らかにした。PD 患者由来の変異体では、このメカニズムが破綻しているために PD 発症機構との関連が強く示唆された。さらに本研究で明らかになったミトコンドリアの不良を監視する PINK1 の「量」と「質」の制御メカニズムは、細胞の増殖によって不良品を浄化できないニューロンなど非分裂細胞におけるミトコンドリアの恒常性維持の根幹であり、PD のみならず他の多くの神経変性疾患の発症機構解明や予防・治療法の開発へ向けての波及効果が期待される。

7. 謝辞 (Acknowledgments)

本研究を行うにあたり、*PINK1*^{-/-} MEF を供与頂きました Harvard Medical School Jie Shen 教授、Plat-E 細胞を供与頂きました東京大学 北村 俊雄 教授、プラスミドを供与頂きました東京大学 岩坪 威 教授と高鳥 翔 博士研究員に深く感謝申し上げます。また、リン酸化タンパク質およびミトコンドリアタンパク質の解析に対して、ご助言を賜りました立教大学 岡 敏彦 教授と徳島大学 小迫 英尊 教授に深く感謝申し上げます。最後に本稿を作成するにあたり、ご指導、ご助言を賜りました臨床医学総合研究所タンパク質代謝研究室、田中 啓二 所長、松田 憲之 研究員に深く感謝申し上げます。

8. 図表の説明 (Legends to the figures)

表 1. 使用したプラスミドの一覧

一過的な発現のために、表記の遺伝子が組込まれた pcDNA3.1、pCMV14(sigma)、pEGFP、pCMVTNT、pCMVTNT (d1)を使用した。安定発現細胞株の取得には表記の遺伝子が組込まれた pMXs-puro を使用した。

図 1 PINK1 と Parkin の歴史

PINK1 (ミトコンドリア局在型タンパク質リン酸化酵素) と Parkin (RBR 型ユビキチン連結酵素) の発見から現在に至までの解析の年表。

図 2 ユビキチン化反応と細胞内のタンパク質分解経路

(a) ユビキチン化反応とユビキチン連結酵素 (E3) による基質タンパク質へのユビキチン化様式。(b) 細胞内のタンパク質分解経路であるユビキチン-プロテアソーム経路とオートファジーリソソーム経路。

図 3 ミトコンドリアによるエネルギー産生と膜電位

ミトコンドリア呼吸鎖複合体により形成される内膜を隔てたプロトン(H⁺)の濃度勾配 (膜電位) と膜電位を利用したエネルギー産生。ミトコンドリア膜電位のある健全なミトコンドリアは細胞内外の要因から、膜電位の低下した不良ミトコンドリアへと変化する。

図 4 ミトコンドリアのライフサイクル

ミトコンドリアは細胞内で常に分裂と融合を繰り返しているが、膜電位の低下した不良なミトコンドリアは分裂と融合のサイクルから外れ、隔離/分解へ導かれる。PINK1 と Parkin の欠損により、不良ミトコンドリアが蓄積する。

図 5 PINK1 はミトコンドリア膜電位の低下に伴いリン酸化される

(a) HeLa 細胞に PINK1 を過剰発現した際において、Parkin のミトコンドリアへの局在化率と CCCP 処理により生じた内在性 PINK1 による Parkin の膜電位の低下したミトコンドリアへの局在化率を示した。CCCP (10 μM, 1 h) 処理条件下で内在性 PINK1 は過剰発現した PINK1 より効率的にミトコンドリアへ Parkin を局在化する。各条件で 100 細胞以上の観察を行い、Parkin がミトコ

ンドリアに局在している細胞を数えた。エラーバーは独立に3回実験した平均 ± 標準偏差値を示している。右上の細胞は共局在を示し、右下は非共局在の例を示している (スケールバーは 10 μm)。 (b) 外来性と内在性 PINK1 のウエスタンブロッティング。 赤いアスタリスクは内在性 PINK1 を示している。ローディングコントロールとしてアクチンを使用した。 (c) タグ無し PINK1 を発現した HeLa 細胞に、10 μM の CCCP 処理を図に記載した時間行ない、4-12% precast ゲルまたは 7.5% Tris-Glycine ゲル ± 50 μM Phos-tag で分離後に抗 PINK1 抗体を用いたウエスタンブロッティングで検出した。赤いアスタリスクはリン酸化 PINK1 を示している。FL は全長 (Full length) PINK1 を、 $\Delta 1$ は切断型 PINK1 を示している。 (d) *In vitro* で合成した PINK1-3HA とミトコンドリア画分から取得した PINK1-3HA 過剰発現産物を抗 PINK1 抗体でウエスタンブロッティングにより検出した。PINK1 のダブレットは切断ではなく翻訳後修飾に由来する。 (e) キナーゼ活性の無い変異体 (kinase dead: KD) PINK1 はリン酸化バンドを完全に欠いていた。PINK1 野生型 (wild type: WT) または KD を発現した *PINK1*^{+/+} MEF の細胞抽出液および抗 Flag 抗体による免疫沈降産物を 7.5% Tris-Glycine ゲル ± 50 μM phos-tag を使った SDS-PAGE で分離後に抗 PINK1 抗体でウエスタンブロッティングにより検出した。赤いアスタリスクは内在性 PINK1 を示している。 (f) HeLa 細胞の内在性 PINK1 はミトコンドリア膜電位が低下すると全てリン酸化型として存在している。 (g) タグ無し PINK1 を発現した HeLa 細胞に CCCP (10 μM , 1h)、Valinomycin (10 μM , 1h)、Rotenone (200 μM , 24h) 処理を行った。それらのサンプルは 7.5% Tris-Glycine ゲル ± 50 μM phos-tag を使った SDS-PAGE で分離後に抗 PINK1 抗体でウエスタンブロッティングにより検出した。

図 6 PINK1 活性化ループにおける Ser402 変異は自己リン酸化を阻害する

(a) PINK1 S402A 変異体は PINK1 の自己リン酸化に影響を与える。PINK1 の活性化ループ内の Ser/Thr である Ser393、Ser401、Ser402 を単独または複数箇所、Ala に置換した。それらの変異を導入したタグ無し PINK1 を HeLa 細胞に発現させて、7.5% Tris-Glycine ゲル ± 50 μM phos-tag を使った SDS-PAGE で分離後に抗 PINK1 抗体でウエスタンブロッティングにより検出した。赤と黒のアスタリスクはリン酸化 PINK1 を示している。FL は全長 (Full length)

PINK1 を、 $\Delta 1$ は切断型 PINK1 を示している。(b) 様々な生物の PINK1 活性化ループにおける Ser/Thr を赤色で示した。PINK1 Ser402 は進化的によく保存されている。

図 7 PINK1 Ser228 は PINK1 のリン酸化部位である

(a) Mass スペクトラム解析で PINK1 のリン酸化部位を同定した。PINK1-GST を未処理の細胞と CCCP 処理細胞から精製して LC-MS/MS 解析を行なった。PINK1 の 206-230 アミノ酸のリン酸化状態にあるペプチドが検出された。MS/MS データは Ser228、Ser229、Ser230 のいずれかがリン酸化していることを示していた。多重配列解析では PINK1 の Ser228 は良く保存されている。Ser228 は黒い四角の枠で囲んだ。(d) PINK1 の予測構造モデル (PMDB ID: PM0076345) の PINK1 Ser402 と Ser228-230 の拡大図、Ser402 と Ser228-230 及び近傍の Ser/Thr を黄色で示した。(e) PINK1 の S228A 変異体において、Phos-tag SDS-PAGE 後のウエスタンブロッティングでリン酸化バンドが減少していた。該当のバンドを赤いアスタリスクで示した。(f) PINK1 S228A/S402A 変異体は Phos-tag SDS-PAGE 後のウエスタンブロッティングでリン酸化バンドが完全に消失していた。赤いアスタリスクはリン酸化型 PINK1 を示している。

図 8 PINK1 Ser228 と Ser402 のリン酸化は Parkin の局在変化に重要である

(a) GFP-Parkin と CMV または CMV (d1) プロモーターで誘導された PINK1 を共発現した HeLa 細胞を用いて、遺伝子導入 24 時間後に Parkin がミトコンドリアに局在している細胞を数えた。各条件で 100 細胞以上の観察を行い、エラーバーは独立に 3 回実験した平均 \pm 標準偏差値を示している。(b) ウエスタンブロッティングには抗 PINK1 抗体と抗 Parkin 抗体を用いて検出を行なった。赤いアスタリスクは PINK1 を示し、半角括弧はユビキチン (Ub) を示している。(c) *PINK1*^{-/-} MEF に GFP-Parkin と CMV (d1) プロモーターで誘導した PINK1 S228A/S402A または S228D/S402D 変異体を発現し、抗 Parkin 抗体を用いて検出を行なった。赤いアスタリスクは Parkin のユビキチン化を示している。(d) S228A/S402A と S228D/S402D 変異体は Phos-tag SDS-PAGE において、リン酸化バンドが消失している。アスタリスクはリン酸化型 PINK1 を示している。FL と $\Delta 1$ はそれぞれ全長と N 末端切断型 PINK1 を示している。(e) HeLa 細胞に

PINK1の変異体を発現させ、CCCP処理後に抗HA抗体と抗Tom20抗体（ミトコンドリアマーカー）で免疫染色を行なうことでPINK1変異体の細胞内局在を確認した（スケールバーは10 μm ）。(f) *PINK1*^{-/-} MEFにGFP-Parkinと低発現PINK1のS228A/S402AまたはS228D/S402D変異体を共発現した。CCCP処理により野生型PINK1でGFP-Parkinの局在化を誘導できる条件下で、PINK1 S228A/S402AまたはS228D/S402DのParkinの局在変化を観察した（スケールバーは10 μm ）。(g) Parkinがミトコンドリアに局在している細胞を数えた。各条件で100細胞以上の観察を行い、エラーバーは独立に3回実験した平均 \pm 標準偏差値を示している。

図 9 PINK1 はミトコンドリア膜電位の低下に伴い複合体を形成する

(a, b) PINK1 はミトコンドリア膜電位の低下依存的に約 850 kDa の複合体を形成する。HeLa 細胞にタグ無し PINK1 を発現して、CCCP (10 μM , 1 h) 処理を行なった細胞抽出液 (a) またはミトコンドリア画分を含む溶液 (b) を BN-PAGE で分離後に抗 PINK1 抗体で検出した。(c) HeLa 細胞に CCCP (10 μM , 12 h) 処理を行なった細胞抽出液を BN-PAGE で分離後に抗 PINK1 抗体で検出した。(d) HeLa 細胞に PINK1-GFP を発現して、CCCP (10 μM , 3 h) 処理を行い、細胞抽出液を BN-または CN-PAGE で分離後に抗 PINK1 抗体で検出した（左と中央のパネル）。右のパネルは GFP の蛍光を取得した。(e) HeLa 細胞に PINK1-GFP と PINK1-mCherry を単独または共発現して、CCCP (10 μM , 3 h) 処理後のサンプルを CN-PAGE で分離させ、その蛍光を取得した。それぞれのパネルの黒い矢頭は PINK1 の複合体を示している。

図 10 PINK1 複合体には 2 分子の PINK1 が含まれる

(a, b) PINK1-GFP を発現した HeLa 細胞に CCCP (10 μM , 3 h) 処理を行うことで形成された PINK1 複合体に対して、抗 PINK1 (BC100-494) または抗 GFP (A6455, 3E6 or ab6556) 抗体 (a)、抗 Tom20、抗 Tom22、抗 Tom40、抗 Tom70 抗体 (b) を混合した後に CN-PAGE で分離、蛍光の検出を行なった。青い矢頭は PINK1 の複合体を示し、赤い矢頭と線は抗体により認識されてシフトしたバンドを示している。(c) PINK1-GFP または mCherry を発現した HeLa 細胞

に CCCP (10 μ M, 3 h) 処理を行い、抗 GFP 抗体または抗 mCherry 抗体と反応させた。緑のアスタリスクは抗 mCherry 抗体に反応してシフトした PINK1-GFP を示し、赤色のアスタリスクは抗 GFP 抗体に反応してシフトした PINK1-mCherry を示している。(d) PINK1-GFP、-mCherry または-V5 を発現した HeLa 細胞に CCCP (10 μ M, 3 h) 処理を行い、抗 GFP 抗体、抗 mCherry 抗体と抗 V5 抗体と反応させた。

図 11 PINK1 複合体には主としてリン酸化型 PINK1 が含まれる

(a,b) HeLa 細胞にタグ無し PINK1 を発現させて CCCP (10 μ M, 1 h) 処理を行ったサンプル (図 9a で使用したサンプル) は Phos-tag SDS-PAGE により分離後に抗 PINK1 抗体で検出した。(c, d) 赤い矢頭はリン酸化 PINK1 を示している。FL と $\Delta 1$ はそれぞれ全長 (Full length) と切断型 PINK1 を示している。

図 12 PD 患者由来の変異型 PINK1 は複合体形成とリン酸化に異常が生じる

(a) 患者由来の変異を導入した PINK1-GFP を発現した HeLa 細胞に CCCP (10 μ M, 3 h) 処理を行い、CN-PAGE で分離後に複合体を検出した。(b) 発現量を調べるために SDS-PAGE を行ない、抗 PINK1 抗体で検出した。(c) 複合体が検出された変異体 PINK1-GFP を含む細胞抽出液に抗 Tom20、抗 Tom22、抗 Tom40、抗 Tom70 抗体を混合した後に CN-PAGE で分離、蛍光の検出を行なった。青い矢頭は PINK1 の複合体、青い線はシフトバンドを示している。FL は全長 (Full length) PINK1 を、 $\Delta 1$ は切断型 PINK1 を示している。(d) 患者由来の変異を導入した PINK1-Flag を発現した HeLa 細胞に CCCP (10 μ M, 1 h) 処理を行い、Phos-tag SDS-PAGE で分離後に PINK1 のリン酸化を検出した。

図 13 PINK1 は分子間でリン酸化反応を行なう

(a) 患者由来の変異を導入した PINK1-Flag と野生型の PINK1-GFP を発現した HeLa 細胞に CCCP (10 μ M, 1 h) 処理を行い、Phos-tag SDS-PAGE で分離後に PINK1 のリン酸化を検出した。(b) G409V 変異を導入した PINK1-Flag と野生型またはキナーゼ活性の無い変異型 (KD) PINK1-GFP を発現した HeLa

細胞に CCCP (10 μ M, 1 h) 処理を行い、Phos-tag SDS-PAGE で分離後に PINK1 のリン酸化を検出した。

図 14 PD 患者由来の変異型 PINK1 は Parkin を不良ミトコンドリアへ局在化できない

(a) GFP-Parkin と患者由来の変異体 PINK1-Flag を発現した *PINK1*^{-/-}MEF に CCCP (30 μ M, 1 h) 処理を行い、免疫染色により細胞内局在を調べた。各変異体で 100 細胞以上の観察を行い、エラーバーは独立に 3 回実験した平均 \pm 標準偏差値を示している。(b) また細胞抽出液を SDS-PAGE で分離後に抗 PINK1 抗体と抗 Parkin 抗体で検出を行なった。赤いアスタリスクはユビキチン化を示している。

図 15 本研究により明らかになったミトコンドリア品質管理における PINK1 と Parkin の作動機構モデル

PINK1 は平常時にミトコンドリア膜電位依存的な輸送に伴って切断と分解を受ける。一方で、膜電位の低下したミトコンドリアでは内膜への輸送が停止することで外膜に蓄積する。蓄積した PINK1 は複合体形成と自己リン酸化反応を経て、Parkin を不良ミトコンドリアへ局在化させる。不良ミトコンドリアに局在化した Parkin は活性型となり、表記した多くのミトコンドリアタンパク質をユビキチン化して主としてオートファジーによる分解へ導く。このモデルは、家族性 PD 患者に由来する PINK1 や Parkin の変異機構解析から導き出した仮説であるが、孤発性 PD 患者でもミトコンドリアの恒常性維持の破綻が数多く報告されており、ミトコンドリアの品質管理の一般的な原理となる可能性が高いと思われる。

9. 文献 (References)

- 1 Yamamura, Y., Sobue, I., Ando, K., Iida, M. & Yanagi, T. Paralysis agitans of early onset with marked diurnal fluctuation of symptoms. *Neurology* **23**, 239-244 (1973).
- 2 Betarbet, R. *et al.* Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature neuroscience* **3**, 1301-1306, doi:10.1038/81834 (2000).
- 3 Langston, J. W., Ballard, P., Tetrud, J. W. & Irwin, I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* **219**, 979-980 (1983).
- 4 Schapira, A. H. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet neurology* **7**, 97-109, doi:10.1016/S1474-4422(07)70327-7 (2008).
- 5 Maries, E., Dass, B., Collier, T. J., Kordower, J. H. & Steece-Collier, K. The role of alpha-synuclein in Parkinson's disease: insights from animal models. *Nature reviews. Neuroscience* **4**, 727-738, doi:10.1038/nrn1199 (2003).
- 6 Kitada, T. *et al.* Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* **392**, 605-608, doi:10.1038/33416 (1998).
- 7 Shimura, H. *et al.* Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nature genetics* **25**, 302-305, doi:10.1038/77060 (2000).
- 8 Imai, Y., Soda, M. & Takahashi, R. Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. *The Journal of biological chemistry* **275**, 35661-35664, doi:10.1074/jbc.C000447200 (2000).
- 9 Kahle, P. J. & Haass, C. How does parkin ligate ubiquitin to Parkinson's disease? *EMBO reports* **5**, 681-685, doi:10.1038/sj.embor.7400188 (2004).
- 10 Ravid, T. & Hochstrasser, M. Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nature reviews. Molecular cell biology*

- 9, 679-690, doi:10.1038/nrm2468 (2008).
- 11 Wenzel, D. M., Lissounov, A., Brzovic, P. S. & Klevit, R. E. UBCH7 reactivity profile reveals parkin and HHARI to be RING/HECT hybrids. *Nature* **474**, 105-108, doi:10.1038/nature09966 (2011).
 - 12 Iguchi, M. *et al.* Parkin-catalyzed ubiquitin-ester transfer is triggered by PINK1-dependent phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* **288**, 22019-22032, doi:10.1074/jbc.M113.467530 (2013).
 - 13 Riley, B. E. *et al.* Structure and function of Parkin E3 ubiquitin ligase reveals aspects of RING and HECT ligases. *Nature communications* **4**, 1982, doi:10.1038/ncomms2982 (2013).
 - 14 Lazarou, M. *et al.* PINK1 drives Parkin self-association and HECT-like E3 activity upstream of mitochondrial binding. *The Journal of cell biology* **200**, 163-172, doi:10.1083/jcb.201210111 (2013).
 - 15 Ye, Y. & Rape, M. Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. *Nature reviews. Molecular cell biology* **10**, 755-764, doi:10.1038/nrm2780 (2009).
 - 16 Murata, S., Yashiroda, H. & Tanaka, K. Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nature reviews. Molecular cell biology* **10**, 104-115, doi:10.1038/nrm2630 (2009).
 - 17 Youle, R. J. & Narendra, D. P. Mechanisms of mitophagy. *Nature reviews. Molecular cell biology* **12**, 9-14, doi:10.1038/nrm3028 (2011).
 - 18 Mizushima, N. & Komatsu, M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* **147**, 728-741, doi:10.1016/j.cell.2011.10.026 (2011).
 - 19 Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y. & Ohsumi, Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nature reviews. Molecular cell biology* **10**, 458-467, doi:10.1038/nrm2708 (2009).
 - 20 Unoki, M. & Nakamura, Y. Growth-suppressive effects of BPOZ and EGR2, two genes involved in the PTEN signaling pathway. *Oncogene* **20**, 4457-4465, doi:10.1038/sj.onc.1204608 (2001).
 - 21 Valente, E. M. *et al.* Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* **304**, 1158-1160,

- doi:10.1126/science.1096284 (2004).
- 22 Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D. F. & Youle, R. J. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *The Journal of cell biology* **183**, 795-803, doi:10.1083/jcb.200809125 (2008).
 - 23 Matsuda, N. *et al.* PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *The Journal of cell biology* **189**, 211-221, doi:10.1083/jcb.200910140 (2010).
 - 24 Narendra, D. P. *et al.* PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS biology* **8**, e1000298, doi:10.1371/journal.pbio.1000298 (2010).
 - 25 Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **414**, 813-820, doi:10.1038/414813a (2001).
 - 26 Twig, G. *et al.* Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *The EMBO journal* **27**, 433-446, doi:10.1038/sj.emboj.7601963 (2008).
 - 27 Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A. & Mammucari, C. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology* **13**, 566-578, doi:10.1038/nrm3412 (2012).
 - 28 West, A. P., Shadel, G. S. & Ghosh, S. Mitochondria in innate immune responses. *Nature reviews. Immunology* **11**, 389-402, doi:10.1038/nri2975 (2011).
 - 29 Lev, S. Non-vesicular lipid transport by lipid-transfer proteins and beyond. *Nature reviews. Molecular cell biology* **11**, 739-750, doi:10.1038/nrm2971 (2010).
 - 30 Galluzzi, L., Blomgren, K. & Kroemer, G. Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. *Nature reviews. Neuroscience* **10**, 481-494, doi:10.1038/nrn2665 (2009).
 - 31 Stranahan, A. M. & Mattson, M. P. Recruiting adaptive cellular stress responses for successful brain ageing. *Nature reviews. Neuroscience* **13**, 209-216, doi:10.1038/nrn3151 (2012).

- 32 Yang, Y. *et al.* Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of *Drosophila* Pink1 is rescued by Parkin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 10793-10798, doi:10.1073/pnas.0602493103 (2006).
- 33 Park, J. *et al.* Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature* **441**, 1157-1161, doi:10.1038/nature04788 (2006).
- 34 Clark, I. E. *et al.* *Drosophila* pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature* **441**, 1162-1166, doi:10.1038/nature04779 (2006).
- 35 Burman, J. L., Yu, S., Poole, A. C., Decal, R. B. & Pallanck, L. Analysis of neural subtypes reveals selective mitochondrial dysfunction in dopaminergic neurons from parkin mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 10438-10443, doi:10.1073/pnas.1120688109 (2012).
- 36 Jin, S. M. & Youle, R. J. The accumulation of misfolded proteins in the mitochondrial matrix is sensed by PINK1 to induce PARK2/Parkin-mediated mitophagy of polarized mitochondria. *Autophagy* **9**, 1750-1757, doi:10.4161/auto.26122 (2013).
- 37 Pimenta de Castro, I. *et al.* Genetic analysis of mitochondrial protein misfolding in *Drosophila melanogaster*. *Cell death and differentiation* **19**, 1308-1316, doi:10.1038/cdd.2012.5 (2012).
- 38 Yang, Y. *et al.* Pink1 regulates mitochondrial dynamics through interaction with the fission/fusion machinery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 7070-7075, doi:10.1073/pnas.0711845105 (2008).
- 39 Deng, H., Dodson, M. W., Huang, H. & Guo, M. The Parkinson's disease genes pink1 and parkin promote mitochondrial fission and/or inhibit fusion in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 14503-14508, doi:10.1073/pnas.0803998105 (2008).
- 40 Vos, M. *et al.* Vitamin K2 is a mitochondrial electron carrier that

- rescues pink1 deficiency. *Science* **336**, 1306-1310, doi:10.1126/science.1218632 (2012).
- 41 Vilain, S. *et al.* The yeast complex I equivalent NADH dehydrogenase rescues pink1 mutants. *PLoS genetics* **8**, e1002456, doi:10.1371/journal.pgen.1002456 (2012).
- 42 Kitada, T., Tong, Y., Gautier, C. A. & Shen, J. Absence of nigral degeneration in aged parkin/DJ-1/PINK1 triple knockout mice. *Journal of neurochemistry* **111**, 696-702, doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06350.x (2009).
- 43 Kitada, T. *et al.* Impaired dopamine release and synaptic plasticity in the striatum of parkin^{-/-} mice. *Journal of neurochemistry* **110**, 613-621, doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06152.x (2009).
- 44 Gautier, C. A., Kitada, T. & Shen, J. Loss of PINK1 causes mitochondrial functional defects and increased sensitivity to oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 11364-11369, doi:10.1073/pnas.0802076105 (2008).
- 45 Kitada, T. *et al.* Impaired dopamine release and synaptic plasticity in the striatum of PINK1-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 11441-11446, doi:10.1073/pnas.0702717104 (2007).
- 46 Perez, F. A. & Palmiter, R. D. Parkin-deficient mice are not a robust model of parkinsonism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 2174-2179, doi:10.1073/pnas.0409598102 (2005).
- 47 Palacino, J. J. *et al.* Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *The Journal of biological chemistry* **279**, 18614-18622, doi:10.1074/jbc.M401135200 (2004).
- 48 Goldberg, M. S. *et al.* Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons. *The Journal of biological chemistry* **278**, 43628-43635, doi:10.1074/jbc.M308947200 (2003).
- 49 Schmidt, O., Pfanner, N. & Meisinger, C. Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nature reviews*.

- Molecular cell biology* **11**, 655-667, doi:10.1038/nrm2959 (2010).
- 50 Yamano, K. & Youle, R. J. PINK1 is degraded through the N-end rule pathway. *Autophagy* **9**, 1758-1769, doi:10.4161/auto.24633 (2013).
- 51 Meissner, C., Lorenz, H., Weihofen, A., Selkoe, D. J. & Lemberg, M. K. The mitochondrial intramembrane protease PARL cleaves human Pink1 to regulate Pink1 trafficking. *Journal of neurochemistry* **117**, 856-867, doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07253.x (2011).
- 52 Deas, E. *et al.* PINK1 cleavage at position A103 by the mitochondrial protease PARL. *Human molecular genetics* **20**, 867-879, doi:10.1093/hmg/ddq526 (2011).
- 53 Jin, S. M. *et al.* Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. *The Journal of cell biology* **191**, 933-942, doi:10.1083/jcb.201008084 (2010).
- 54 Greene, A. W. *et al.* Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment. *EMBO reports* **13**, 378-385, doi:10.1038/embor.2012.14 (2012).
- 55 Vives-Bauza, C. *et al.* PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 378-383, doi:10.1073/pnas.0911187107 (2010).
- 56 Sarraf, S. A. *et al.* Landscape of the PARKIN-dependent ubiquitylome in response to mitochondrial depolarization. *Nature* **496**, 372-376, doi:10.1038/nature12043 (2013).
- 57 Okatsu, K. *et al.* Mitochondrial hexokinase HKI is a novel substrate of the Parkin ubiquitin ligase. *Biochemical and biophysical research communications* **428**, 197-202, doi:10.1016/j.bbrc.2012.10.041 (2012).
- 58 Chan, N. C. *et al.* Broad activation of the ubiquitin-proteasome system by Parkin is critical for mitophagy. *Human molecular genetics* **20**, 1726-1737, doi:10.1093/hmg/ddr048 (2011).
- 59 Kimura, Y. *et al.* Different dynamic movements of wild-type and pathogenic VCPs and their cofactors to damaged mitochondria in a Parkin-mediated mitochondrial quality control system. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, doi:10.1111/gtc.12103

- (2013).
- 60 Tanaka, A. *et al.* Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *The Journal of cell biology* **191**, 1367-1380, doi:10.1083/jcb.201007013 (2010).
- 61 Okatsu, K. *et al.* p62/SQSTM1 cooperates with Parkin for perinuclear clustering of depolarized mitochondria. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **15**, 887-900, doi:10.1111/j.1365-2443.2010.01426.x (2010).
- 62 Narendra, D., Kane, L. A., Hauser, D. N., Fearnley, I. M. & Youle, R. J. p62/SQSTM1 is required for Parkin-induced mitochondrial clustering but not mitophagy; VDAC1 is dispensable for both. *Autophagy* **6**, 1090-1106 (2010).
- 63 Geisler, S. *et al.* PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nature cell biology* **12**, 119-131, doi:10.1038/ncb2012 (2010).
- 64 Yoshii, S. R., Kishi, C., Ishihara, N. & Mizushima, N. Parkin mediates proteasome-dependent protein degradation and rupture of the outer mitochondrial membrane. *The Journal of biological chemistry* **286**, 19630-19640, doi:10.1074/jbc.M110.209338 (2011).
- 65 Kane, L. A. & Youle, R. J. PINK1 and Parkin flag Miro to direct mitochondrial traffic. *Cell* **147**, 721-723, doi:10.1016/j.cell.2011.10.028 (2011).
- 66 Koyano, F. *et al.* The principal PINK1 and Parkin cellular events triggered in response to dissipation of mitochondrial membrane potential occur in primary neurons. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **18**, 672-681, doi:10.1111/gtc.12066 (2013).
- 67 Okatsu, K. *et al.* A dimeric PINK1-containing complex on depolarized mitochondria stimulates Parkin recruitment. *The Journal of biological chemistry*, doi:10.1074/jbc.M113.509653 (2013).
- 68 Okatsu, K. *et al.* PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria. *Nature communications* **3**, 1016,

- doi:10.1038/ncomms2016 (2012).
- 69 Wittig, I., Karas, M. & Schagger, H. High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **6**, 1215-1225, doi:10.1074/mcp.M700076-MCP200 (2007).
- 70 Wittig, I., Braun, H. P. & Schagger, H. Blue native PAGE. *Nature protocols* **1**, 418-428, doi:10.1038/nprot.2006.62 (2006).
- 71 Wittig, I. & Schagger, H. Advantages and limitations of clear-native PAGE. *Proteomics* **5**, 4338-4346, doi:10.1002/pmic.200500081 (2005).
- 72 Schagger, H. & von Jagow, G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical biochemistry* **199**, 223-231 (1991).
- 73 Swamy, M., Minguet, S., Siegers, G. M., Alarcon, B. & Schamel, W. W. A native antibody-based mobility-shift technique (NAMOS-assay) to determine the stoichiometry of multiprotein complexes. *Journal of immunological methods* **324**, 74-83, doi:10.1016/j.jim.2007.05.003 (2007).
- 74 Kawajiri, S. *et al.* PINK1 is recruited to mitochondria with parkin and associates with LC3 in mitophagy. *FEBS letters* **584**, 1073-1079, doi:10.1016/j.febslet.2010.02.016 (2010).
- 75 Kim, Y. *et al.* PINK1 controls mitochondrial localization of Parkin through direct phosphorylation. *Biochemical and biophysical research communications* **377**, 975-980, doi:10.1016/j.bbrc.2008.10.104 (2008).
- 76 Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Takiyama, K. & Koike, T. Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **5**, 749-757, doi:10.1074/mcp.T500024-MCP200 (2006).
- 77 Beilina, A. *et al.* Mutations in PTEN-induced putative kinase 1 associated with recessive parkinsonism have differential effects on protein stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 5703-5708, doi:10.1073/pnas.0500617102 (2005).
- 78 Jura, N. *et al.* Catalytic control in the EGF receptor and its connection

- to general kinase regulatory mechanisms. *Molecular cell* **42**, 9-22, doi:10.1016/j.molcel.2011.03.004 (2011).
- 79 Nolen, B., Taylor, S. & Ghosh, G. Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation. *Molecular cell* **15**, 661-675, doi:10.1016/j.molcel.2004.08.024 (2004).
- 80 Huse, M. & Kuriyan, J. The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* **109**, 275-282 (2002).
- 81 Cardona, F., Sanchez-Mut, J. V., Dopazo, H. & Perez-Tur, J. Phylogenetic and in silico structural analysis of the Parkinson disease-related kinase PINK1. *Human mutation* **32**, 369-378, doi:10.1002/humu.21444 (2011).
- 82 Valente, E. M. *et al.* PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. *Annals of neurology* **56**, 336-341, doi:10.1002/ana.20256 (2004).
- 83 Setoguchi, K., Otera, H. & Mihara, K. Cytosolic factor- and TOM-independent import of C-tail-anchored mitochondrial outer membrane proteins. *The EMBO journal* **25**, 5635-5647, doi:10.1038/sj.emboj.7601438 (2006).
- 84 Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P. A. & Kuriyan, J. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell* **125**, 1137-1149, doi:10.1016/j.cell.2006.05.013 (2006).
- 85 Archer, S. L. Mitochondrial dynamics--mitochondrial fission and fusion in human diseases. *The New England journal of medicine* **369**, 2236-2251, doi:10.1056/NEJMr1215233 (2013).
- 86 Taylor, R. W. & Turnbull, D. M. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nature reviews. Genetics* **6**, 389-402, doi:10.1038/nrg1606 (2005).

表 1. 使用したプラスミドの一覧

Vector	description
Plasmids to analyze PINK1 phosphorylation	
pCMV TNT-PINK1 WT-3HA	For expression of WT PINK1-3HA
pcDNA3.1-non tagged PINK1 WT	For transient expression of non-tagged WT PINK1
pMXs-puro-PINK1 WT-3Flag	For retrovirus-mediated expression of WT PINK1-3Flag
pMXs-puro-PINK1 KD-3Flag	For retrovirus-mediated expression of WT PINK1-3Flag
pEGFP-N1- GFP-Parkin WT	For expression of WT GFP-Parkin
Plasmids to analyze phosphorylation in PINK1 activation loop	
pcDNA3.1-non tagged PINK1 S393A	For expression of S393A PINK1
pcDNA3.1-non tagged PINK1 S401A	For expression of S401A PINK1
pcDNA3.1-non tagged PINK1 S402A	For expression of S402A PINK1
pcDNA3.1-non tagged PINK1 S393A/S401A	For expression of S393A/S401A PINK1
pcDNA3.1-non tagged PINK1 S393A/S402A	For expression of S393A/S402A PINK1
pcDNA3.1-non tagged PINK1 S401A/S402A	For expression of S401A/S402A PINK1
pcDNA3.1-non tagged PINK1 S393A/S401A/402A	For expression of S393A/ S401A/S402A PINK1
Plasmids to identified phosphorylation of PINK1 Ser228	
pcDNA3.1-non tagged PINK1 S167A	For expression of S167A PINK1
pcDNA3.1-non tagged PINK1 S225A	For expression of S225A PINK1
pcDNA3.1-non tagged PINK1 S228A	For expression of S228A PINK1
pcDNA3.1-non tagged PINK1 S229A	For expression of S229A PINK1
pcDNA3.1-non tagged PINK1 S230A	For expression of S230A PINK1
pcDNA3.1-non tagged PINK1 S225A/S402A	For expression of S225A/S402A PINK1
pcDNA3.1-non tagged PINK1 S228A/S402A	For expression of S228A/S402A PINK1
pcDNA3.1-non tagged PINK1 S229A/S402A	For expression of S229A/S402A PINK1
pcDNA3.1-non tagged PINK1 S230A/S402A	For expression of S230A/S402A PINK1
Plasmids to analyze phosphorylation of PINK1 Ser228 and Ser402	
pCMV(d1)TnT-PINK1 WT-3HA	For weak expression of WT PINK1-3HA
pMXs-puro-GFP-Parkin	For retrovirus-mediated expression of GFP-Parkin
pCMV(d1)TnT-PINK1 S228A/S402A-3HA	For weak expression of PINK1 S228A/S402A -3HA
pCMV(d1)TnT-PINK1 S228D/S402D-3HA	For weak expression of PINK1 S228D/S402D -3HA

Plasmids to perform 2D BN/SDS-PAGE and established CN-PAGE

pEGFP-N1-PINK1 WT-GFP For expression of WT PINK1-GFP

Plasmids to obtain stoichiometric evidence of PINK1 complex

pCMV14-PINK1 WT-GFP-3Flag For expression of WT PINK1-GFP-3Flag

pCMV14-PINK1 WT-mCherry-3Flag For expression of WT PINK1-mCherry-3Flag

pCDNA3.1-PINK1 WT-V5/His For expression of WT PINK1-V5/His

Plasmids for transient expression of pathogenic mutants of PINK1-GFPs

pEGFP-N1-PINK1 KD-GFP For expression of KD PINK1-GFP

pEGFP-N1-PINK1 G92F-GFP For expression of G92F PINK1-GFP

pEGFP-N1-PINK1 A168P-GFP For expression of A168P PINK1-GFP

pEGFP-N1-PINK1 E240K-GFP For expression of E240K PINK1-GFP

pEGFP-N1-PINK1 H271Q-GFP For expression of H271Q PINK1-GFP

pEGFP-N1-PINK1 G309D-GFP For expression of G309D PINK1-GFP

pEGFP-N1-PINK1 L347P-GFP For expression of L347P PINK1-GFP

pEGFP-N1-PINK1 G386A-GFP For expression of G386A PINK1-GFP

pEGFP-N1-PINK1 G409V-GFP For expression of G409V PINK1-GFP

pEGFP-N1-PINK1 E417G-GFP For expression of E417G PINK1-GFP

pEGFP-N1-PINK1 534insQ-GFP For expression of 534insQ PINK1-GFP

Plasmids for transient expression of pathogenic mutants of PINK1-3Flag

pCMV14-PINK1 WT-3Flag For expression of WT PINK1-3Flag

pCMV14-PINK1 KD-3Flag For expression of KD PINK1-3Flag

pCMV14-PINK1 C92F-3Flag For expression of A168P PINK1-3Flag

pCMV14-PINK1 A168P-3Flag For expression of A168P PINK1-3Flag

pCMV14-PINK1 E240K-3Flag For expression of E240K PINK1-3Flag

pCMV14-PINK1 H271Q-3Flag For expression of H271Q PINK1-3Flag

pCMV14-PINK1 G309D-3Flag For expression of G309D PINK1-3Flag

pCMV14-PINK1 L347P-3Flag For expression of L347P PINK1-3Flag

pCMV14-PINK1 G386A -3Flag For expression of G386A PINK1-3Flag

pCMV14-PINK1 G409V-3Flag For expression of G409V PINK1-3Flag

pCMV14-PINK1 E417G-3Flag For expression of E417G PINK1-3Flag

pCMV14-PINK1 534insQ-3Flag For expression of 534insQ PINK1-3Flag

Plasmids for stable expression of pathogenic mutants of PINK1-3Flag

pMXs-puro-PINK1 WT-3Flag	For retrovirus-mediated expression of WT PINK1-3Flag
pMXs-puro-PINK1 KD-3Flag	For retrovirus-mediated expression of KD PINK1-3Flag
pMXs-puro-PINK1 C92F-3Flag	For retrovirus-mediated expression of A168P PINK1-3Flag
pMXs-puro-PINK1 A168P-3Flag	For retrovirus-mediated expression of A168P PINK1-3Flag
pMXs-puro-PINK1 E240K-3Flag	For retrovirus-mediated expression of E240K PINK1-3Flag
pMXs-puro-PINK1 H271Q-3Flag	For retrovirus-mediated expression of H271Q PINK1-3Flag
pMXs-puro-PINK1 G309D-3Flag	For retrovirus-mediated expression of G309D PINK1-3Flag
pMXs-puro-PINK1 L347P-3Flag	For retrovirus-mediated expression of L347P PINK1-3Flag
pMXs-puro-PINK1 G386A -3Flag	For retrovirus-mediated expression of G386A PINK1-3Flag
pMXs-puro-PINK1 G409V-3Flag	For retrovirus-mediated expression of G409V PINK1-3Flag
pMXs-puro-PINK1 E417G-3Flag	For retrovirus-mediated expression of E417G PINK1-3Flag
pMXs-puro-PINK1 534insQ-3Flag	For retrovirus-mediated expression of 534insQ PINK1-3Flag

WT and KD mean wild-type and kinase dead, respectively.

PINK1 MTS TMD Kinase domain 581 a.a.

ミトコンドリア局在型蛋白質リン酸化酵素

PINK1 の歴史

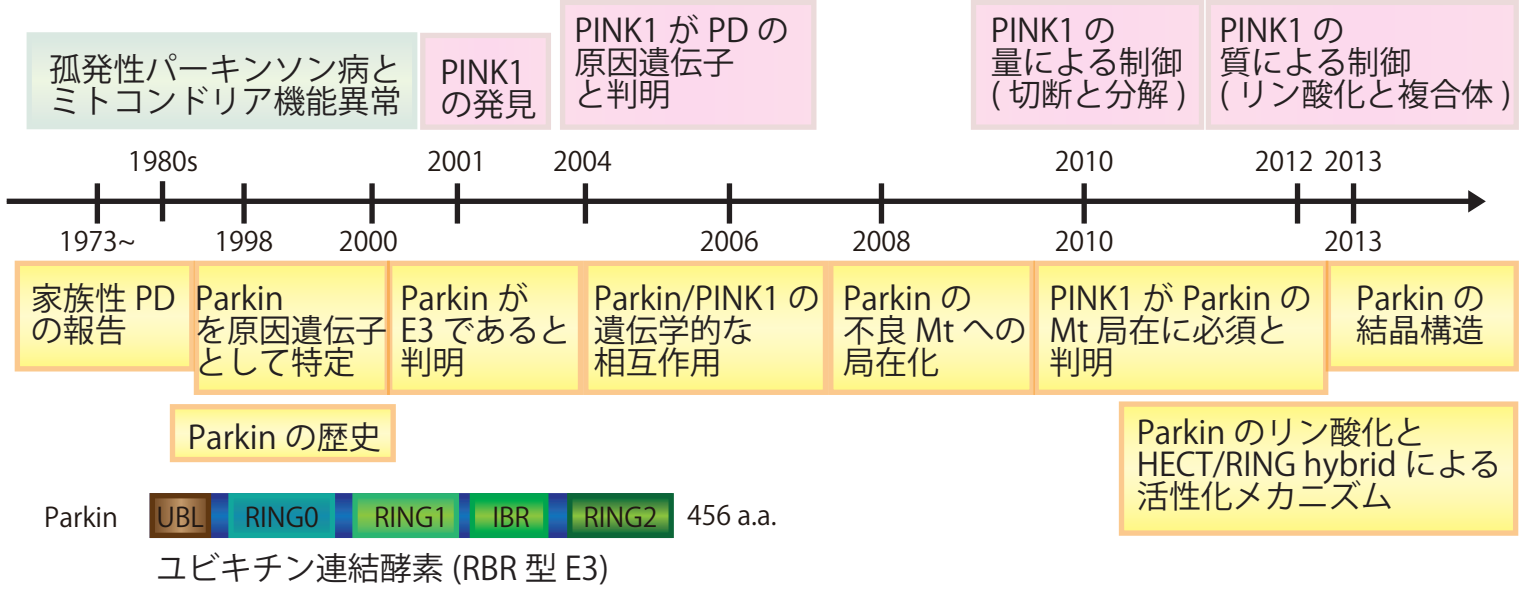


図 1. PINK1 と Parkin の歴史

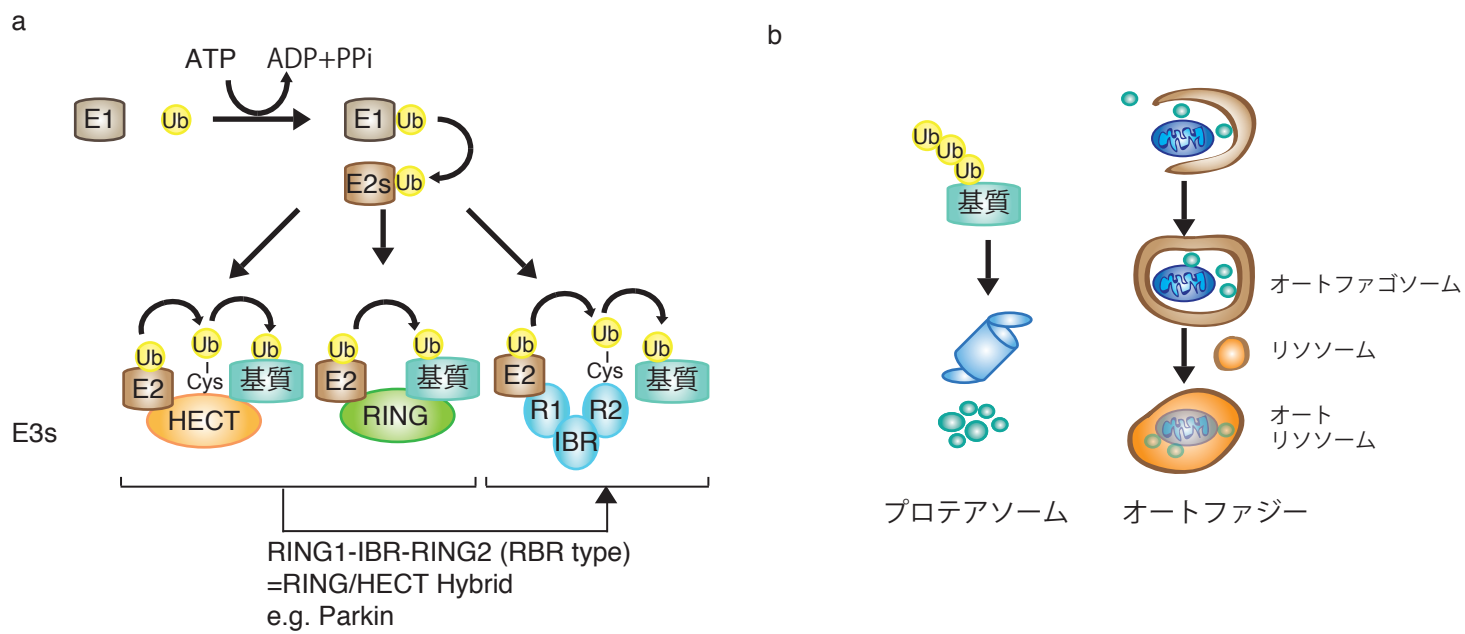


図 2. ユビキチン化反応と細胞内のタンパク質分解経路

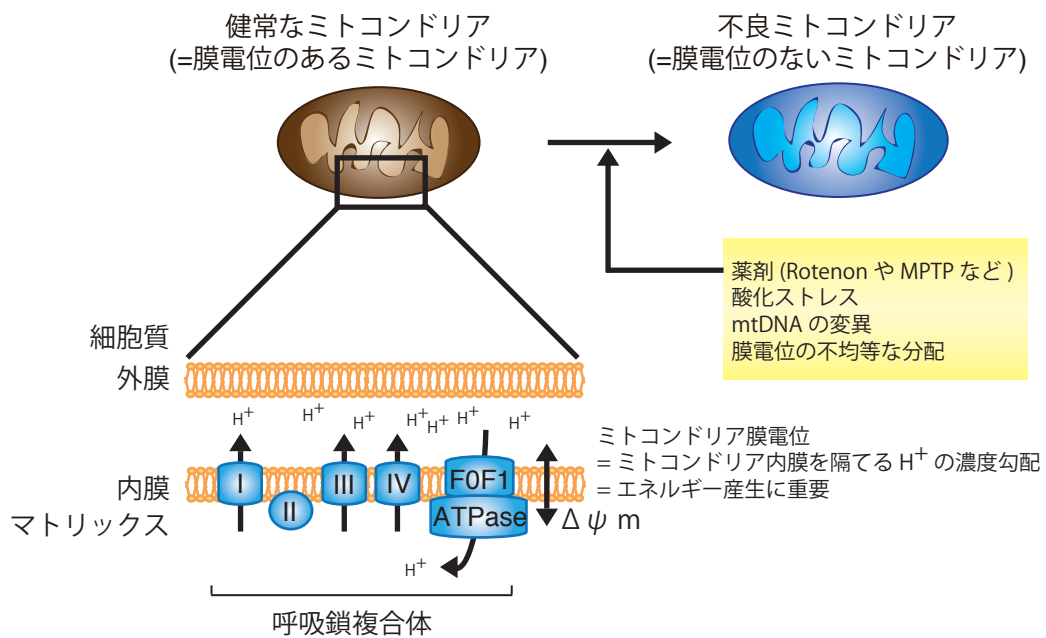


図 3. ミトコンドリアによるエネルギー産生と膜電位

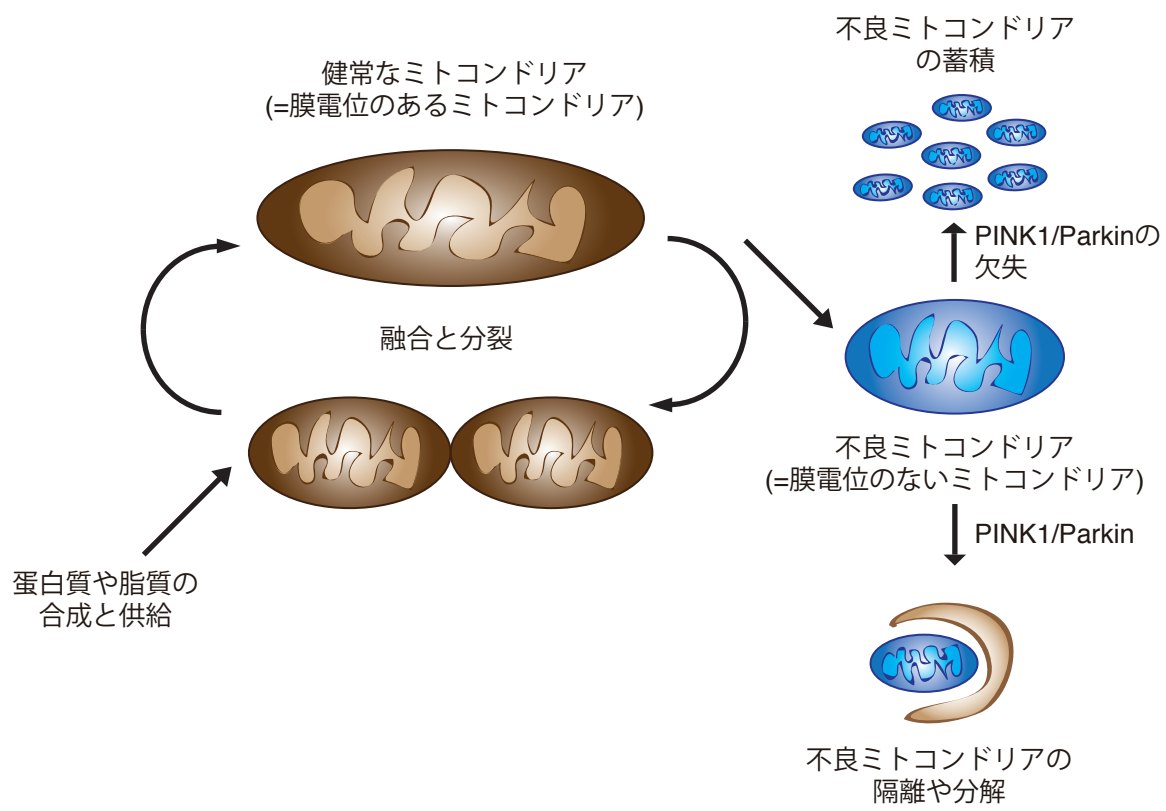


図4. ミトコンドリアのライフサイクル

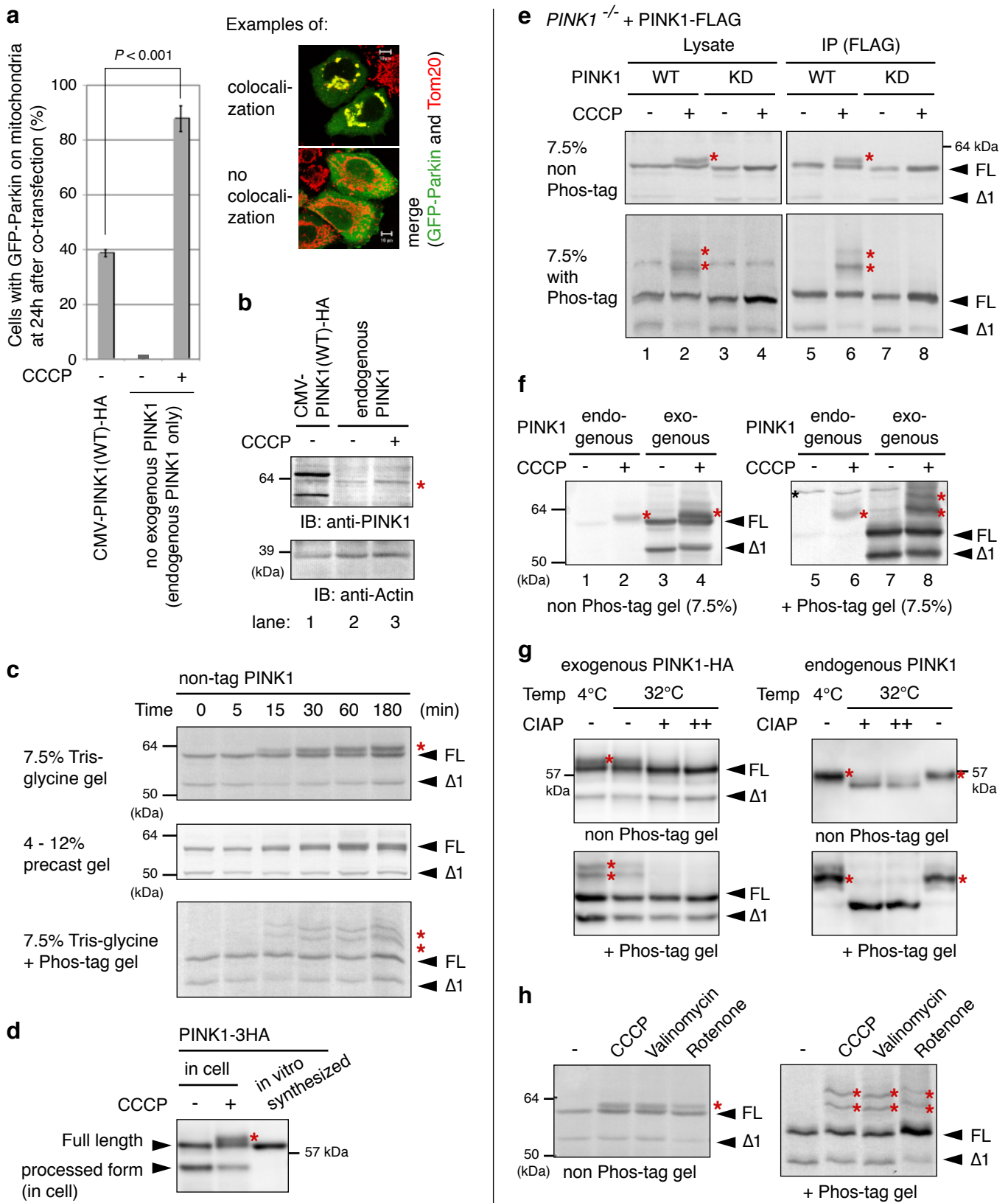


図5. PINK1はミトコンドリア膜電位低下に伴いリン酸化される

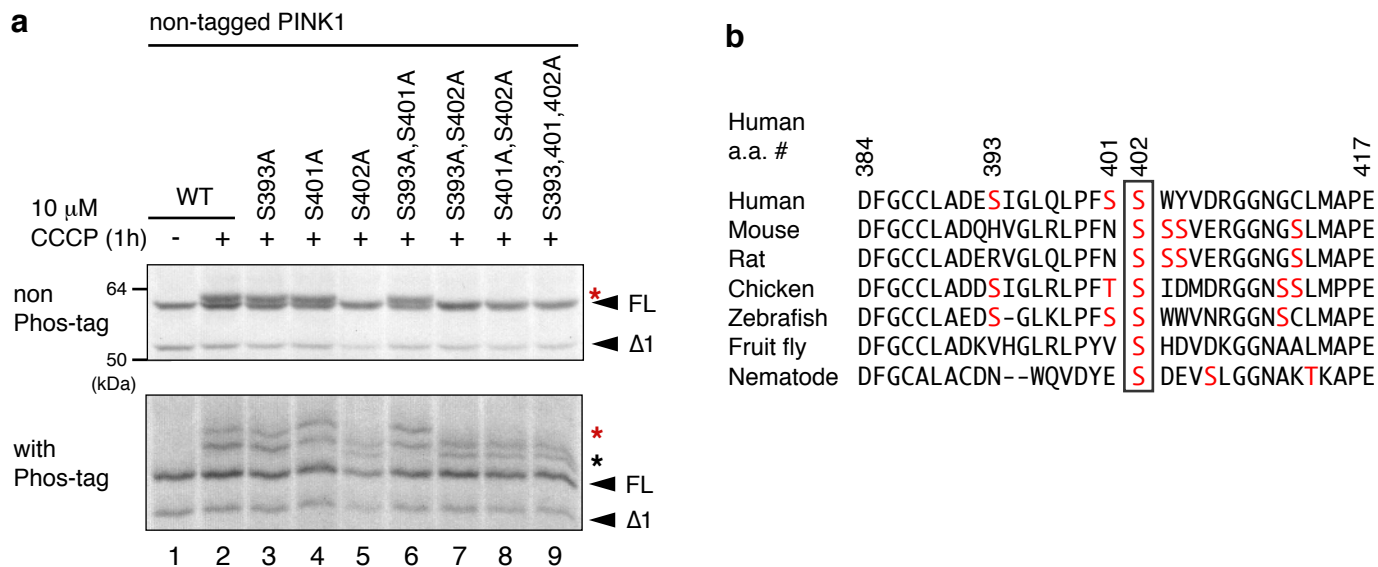
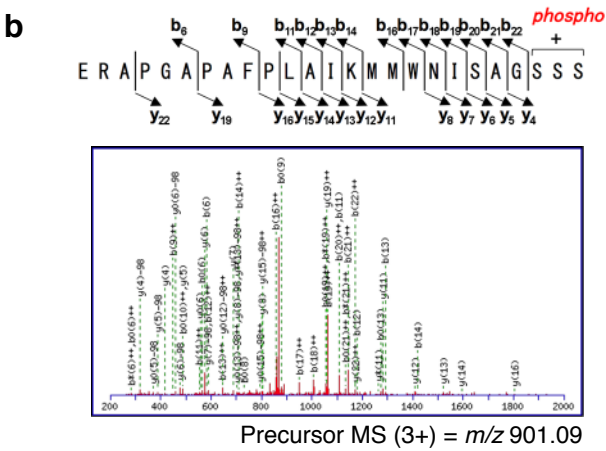
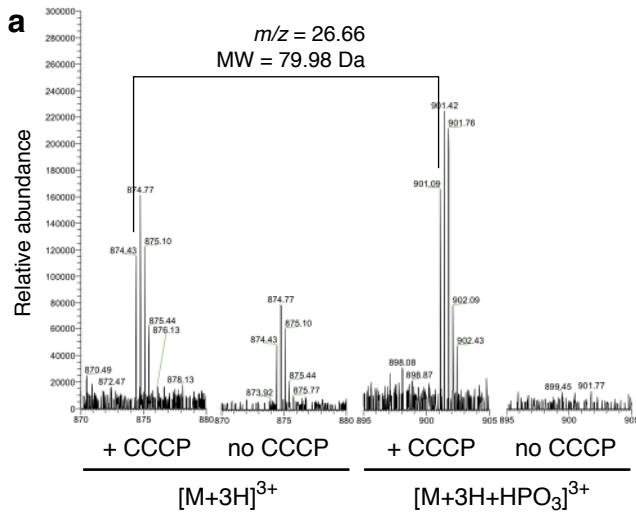


図6.PINK1 活性化ループにおけるSer402変異は自己リン酸化を阻害する



c

Human a.a. #	214	228	229	230	237
Human	FPLAIKMMWNISAG	S	S	S	EAILNTM
Mouse	FPLAIKMMWNISAG	S	S	S	EAILSKM
Rat	FPLAIKMMWNISAG	S	S	S	EAILSKM
Zebrafish	FPLAMKMMWNIAG	S	S	S	DAILRSM
Fruit fly	YPLALKMMFNIDIQ	S	N	A	LILRAM
Nematode	FPLAIKLMFNFEHD	R	D	G	DALLKSM

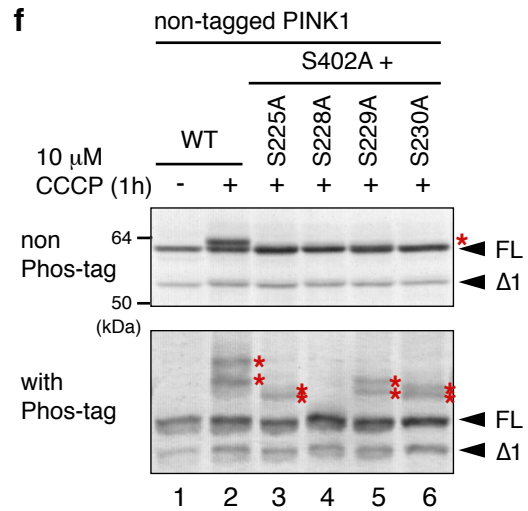
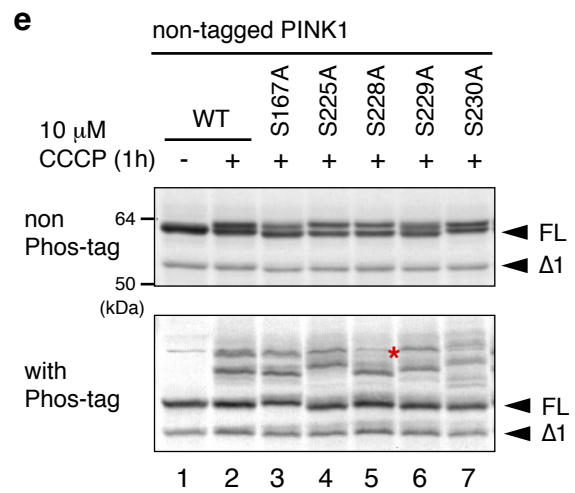
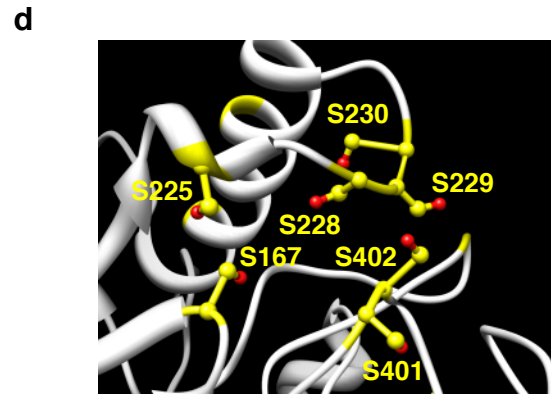


図7. PINK1 Ser228はPINK1のリン酸化部位である

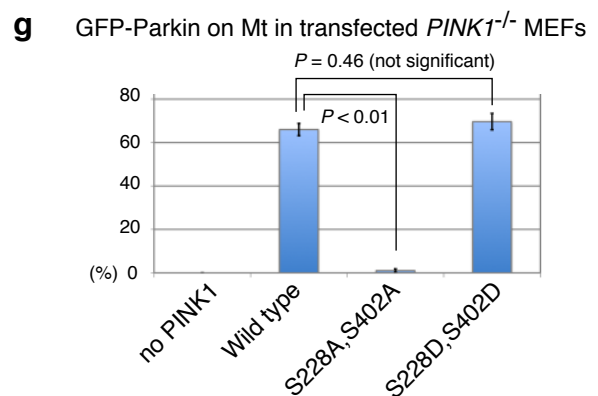
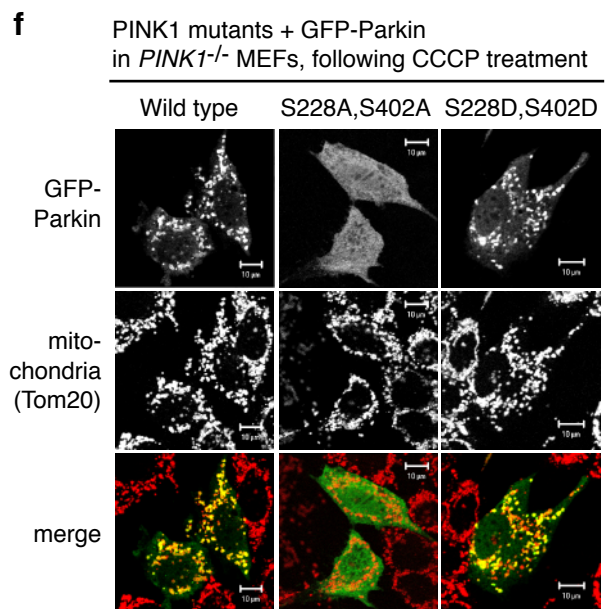
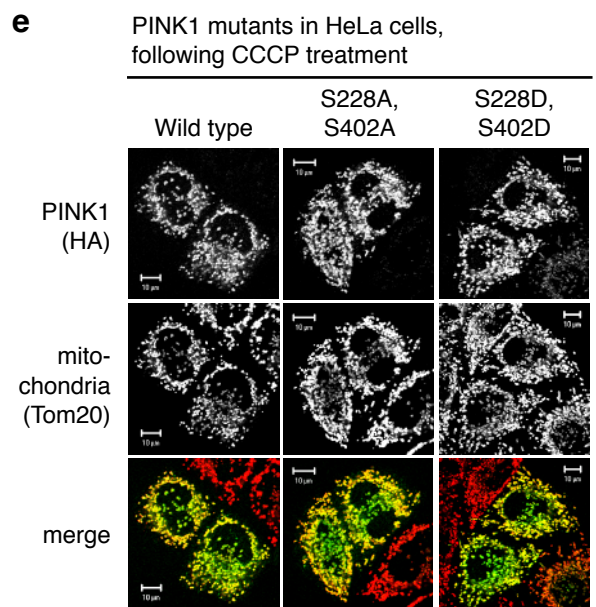
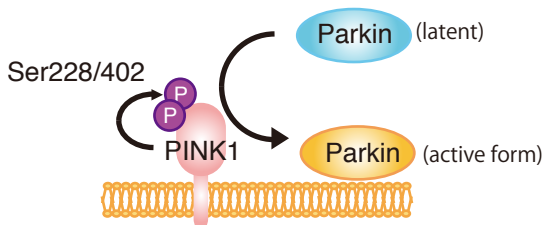
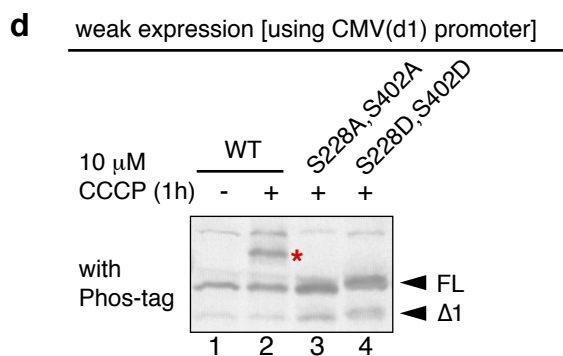
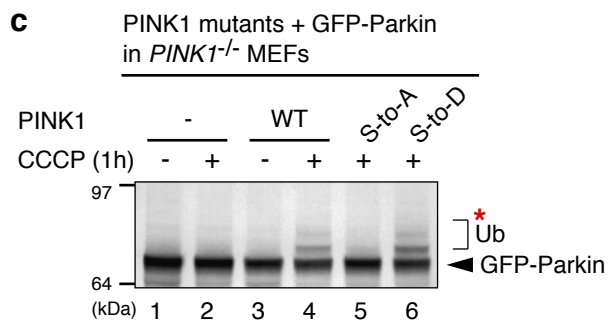
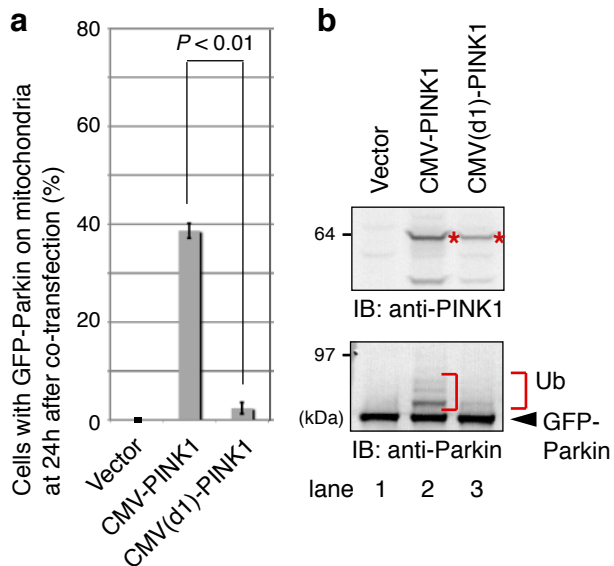


図8. PINK1 Ser228とSer402のリン酸化はParkinの局在変化に重要である

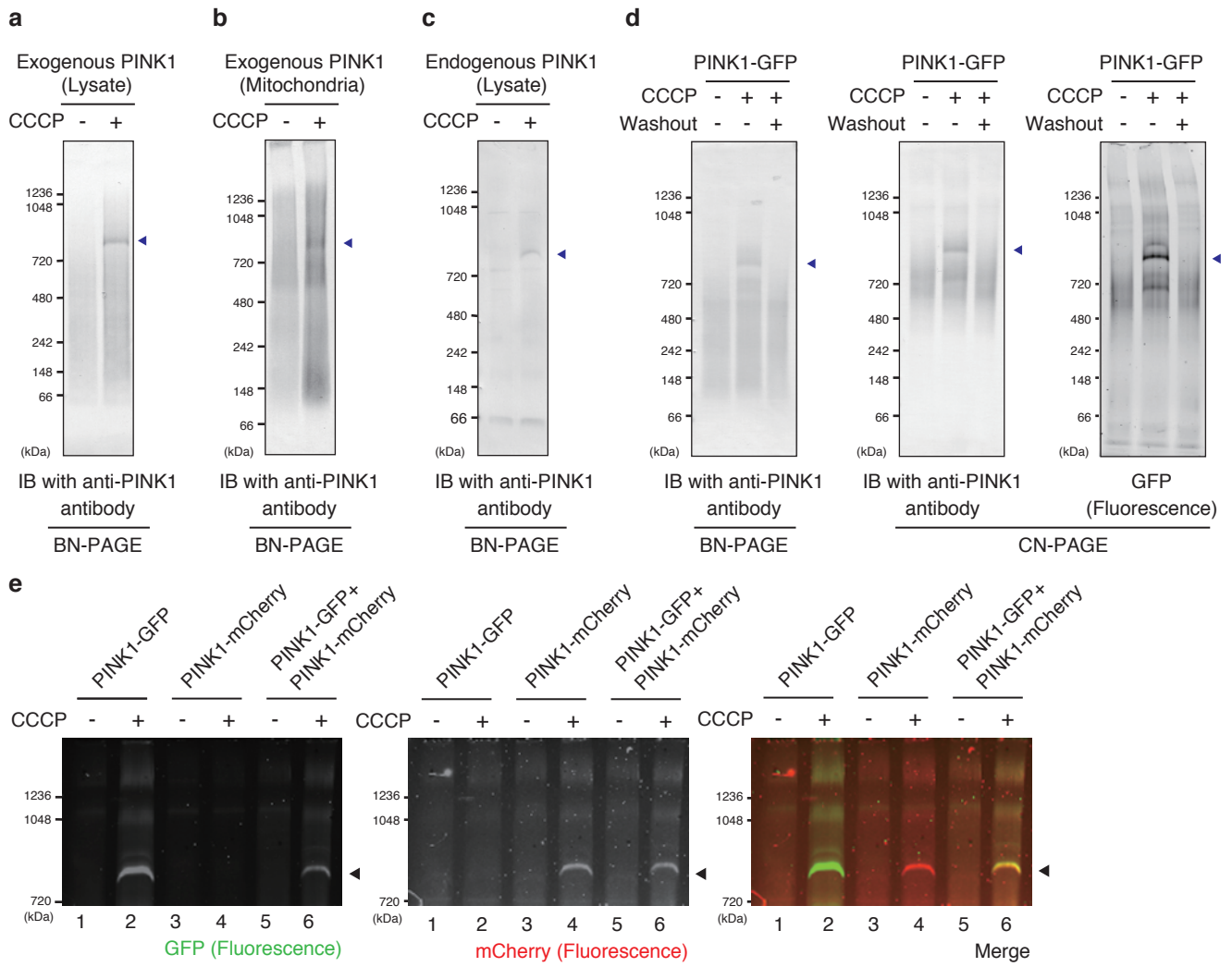


図9. PINK1はミトコンドリア膜電位の低下に伴い複合体を形成する

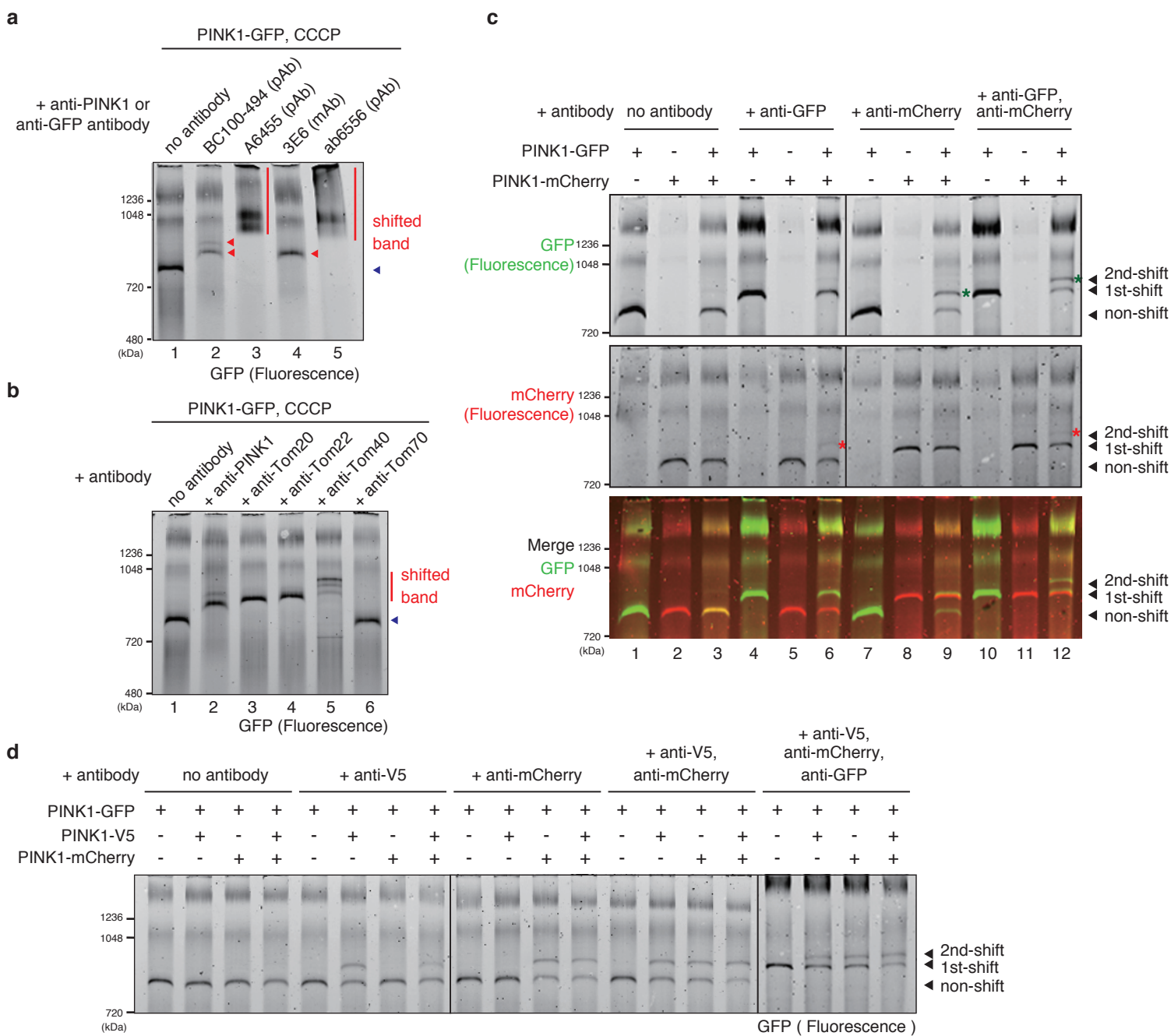


図10. PINK1複合体には2分子のPINK1が含まれる

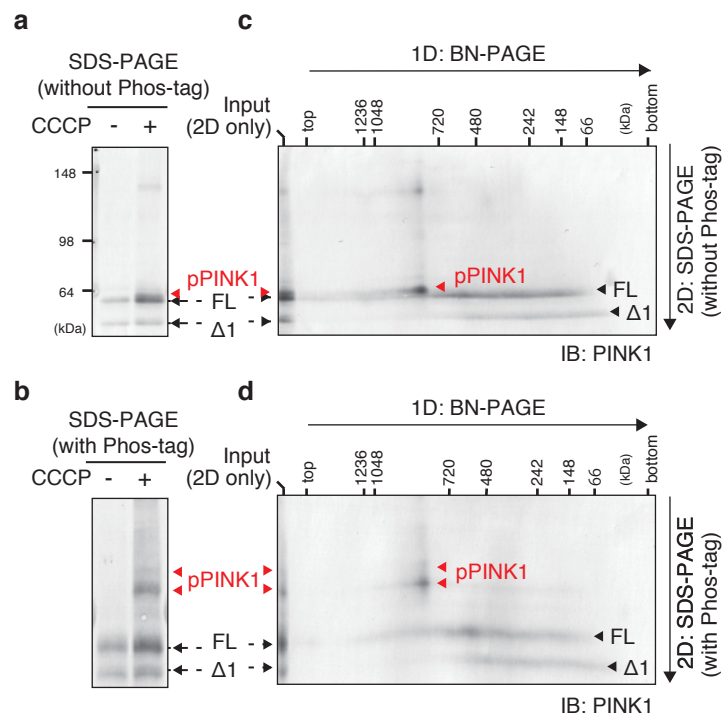


図11. PINK1複合体には主としてリン酸化型PINK1が含まれる

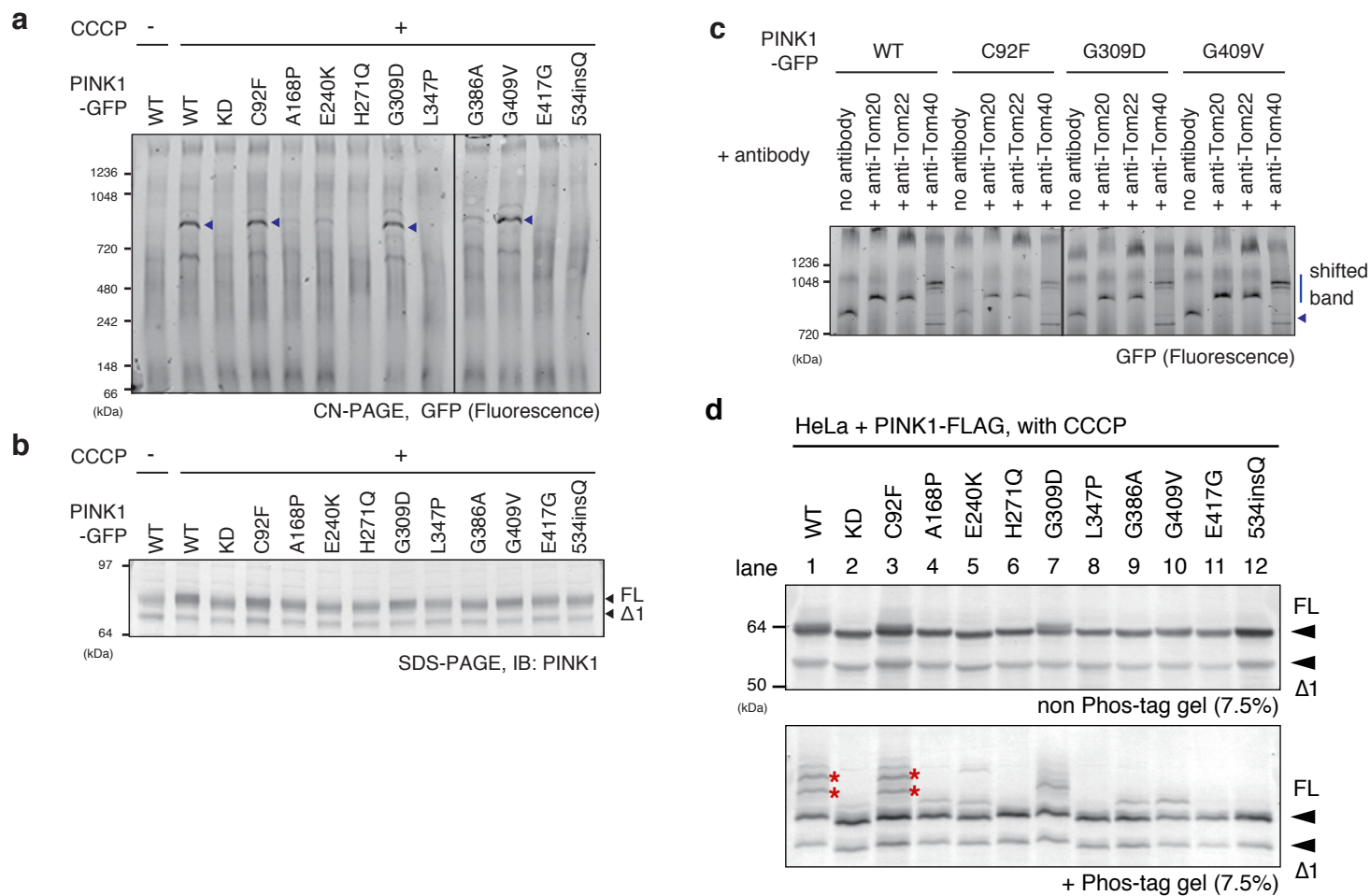


図12. PD患者由来の変異型PINK1は複合体形成とリン酸化に異常が生じる

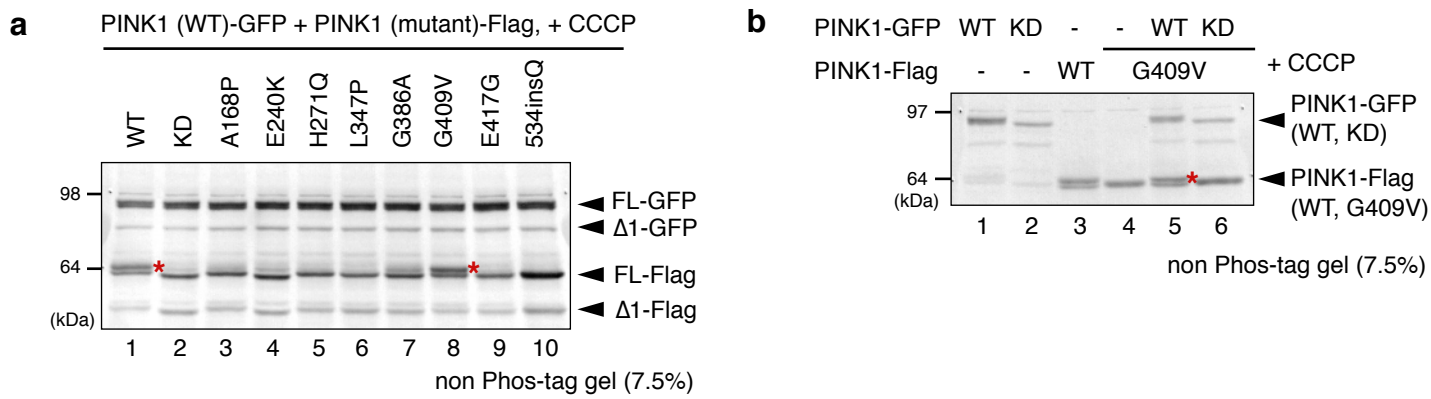


図13. PINK1は分子間でリン酸化反応を行なう

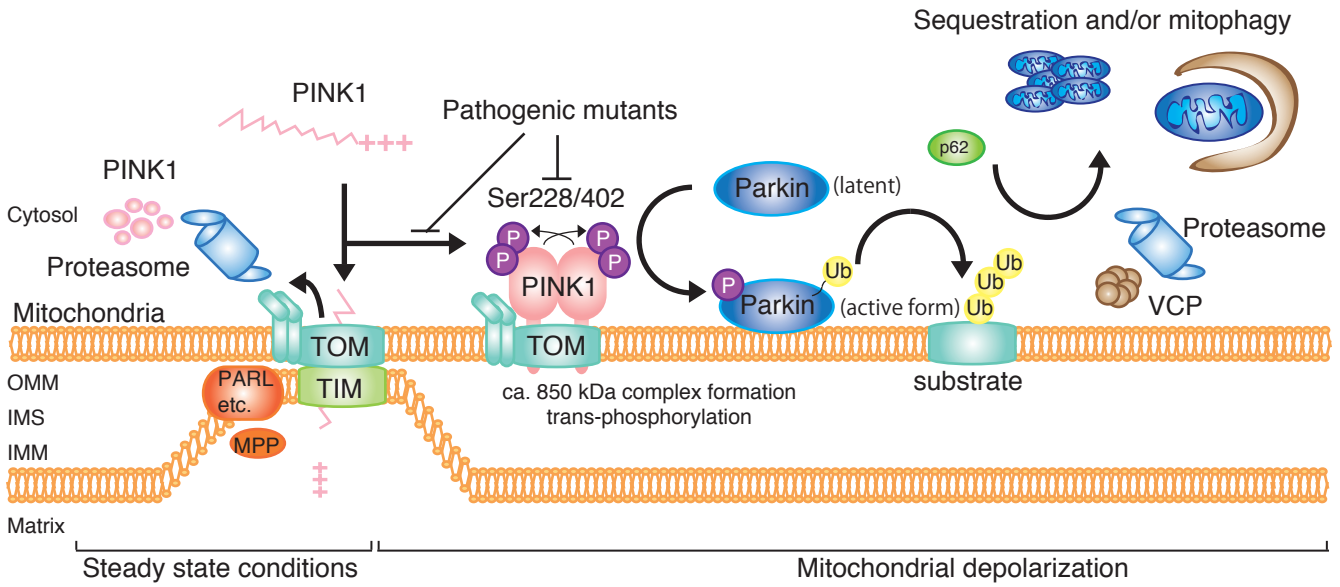


図 15. 本研究により明らかになったミトコンドリア品質管理における PINK1 と Parkin の作動機構モデル